

UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOTO-TOPOTAXIS
BEI EUGLENA GRACILIS

INAUGURAL -DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

im

Fachbereich Biologie

der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von

Eckhard Hoff

aus Großenhain

Marburg/Lahn 1976

UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOTO-TOPOTAXIS
BEI EUGLENA GRACILIS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

im

Fachbereich Biologie

der

Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Eckhard Hoff
aus Großenhain

Marburg/Lahn 1976



Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am : 10. 6.1976

Tag der mündlichen Prüfung : 19.10.1976

Berichterstatter : Prof. Dr. W. Nultsch

Mitberichterstatter : Prof. Dr. G. Throm

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.) EINLEITUNG	1
A.) Lichtinduzierte Bewegungsreaktionen frei beweglicher Mikroorganismen	1
B.) Orientierungsmechanismus der Photo-topotaxis bei Euglena	1
C.) Photorezeptorpigmente	2
2.) METHODISCHE FRAGEN	4
A.) Meßmethoden	4
B.) Die neu entwickelte Versuchsanordnung	11
3.) VERSUCHE ZUR PHOTO-TOPOTAXIS	18
A.) Material und Methodik	18
B.) Versuchsdurchführung und Auswertung	23
C.) Charakterisierung des homokontinuierlich gezogenen Versuchsmaterials	25
D.) Versuche zur Intensitätsabhängigkeit der Photo-topotaxis	28
E.) Versuche mit polarisiertem Licht	30
F.) Aktionsspektrum der Photo-topotaxis	31
4.) VERSUCHE ZUR INTERPRETATION DES AKTIONSSPEKTRUMS	45
A.) Hemmstoffversuche mit DCMU	45
a. Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration	45
b. Bestimmung der Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration	47
c. Photo-topotaktisches Verhalten unter DCMU-Einwirkung bei verschiedenen Wellenlängen	48
B.) Aktionsspektrum der negativen Photo-topotaxis von Euglena gracilis	57
C.) Versuche zur Aerotaxis	59
a. Kapillarversuche	60
b. Versuche in einer Chemotaxiskivette	60
D.) Versuche in der Apparatur nach NULTSCH et al.	62
5.) DISKUSSION	65
6.) ZUSAMMENFASSUNG	71
7.) LITERATURVERZEICHNIS	74

1.) EINLEITUNG

A.) Lichtinduzierte Bewegungsreaktionen frei beweglicher Mikroorganismen

Die grundlegende Klassifizierung lichtinduzierter Bewegungsreaktionen frei beweglicher Mikroorganismen wurde seit PFIEFFER (1904) bis heute beibehalten. Die drei Grundtypen dieser Reaktionen sind: Photokinesis, Photo-phobotaxis und Photo-topotaxis.

Die Problematik dieser Einteilung sowie der Terminologie behandelt NULTSCH (1975).

B.) Orientierungsmechanismus der Photo-topotaxis bei Euglena

Die Untersuchungen von BÜNNING und SCHNEIDERHÖHN (1956), BÜNNING und TAZAWA (1957) und GÖSSEL (1957) unterstützen die Hypothese von MAST (1911), daß bei Euglena das Stigma als Schattensponder für den Paraflagellarkörper fungiert.

Bei der Fortbewegung rotiert Euglena um die Längsachse, so daß bei seitlich einfallendem Licht das Stigma den Paraflagellarkörper periodisch beschattet. Auf jede Beschattung reagiert die Euglena-Zelle mit einer Änderung des Geißelschlages, bis sie eine Position erreicht, in der keine Beschattung mehr erfolgt, d. h. in der sie sich auf die Lichtquelle zu bewegt.

Diese periodischen Änderungen des Geißelschlages, die die Bewegungsrichtung korrigieren, sind phobische Reaktionen. Die Summation der phobischen Einzelreaktionen führt zu der photo-topotaktischen Orientierung. Für die negative Photo-topotaxis nimmt man an, daß hierbei das Stigma keine Rolle spielt und der Paraflagellarkörper die Reaktion steuert.

Obwohl die meisten Befunde für obige Hypothese sprechen, sahen BATRA und TOLLIN (1964), STROTHER und WOLKEN (1960) und WOLKEN und SHIN (1958) das Stigma als Photorezeptor an.

Detailliertere Darstellungen mit Zitaten der Originalarbeiten und weiterer Review-Artikel finden sich in den zusammenfassenden Arbeiten von HAUPT (1959, 1966, 1972), FEINLEIB und CURRY (1971) und CHECCUCCI (1973).

C.) Photorezeptorpigmente

Erste Aufschlüsse über Photorezeptorpigmente können Aktionsspektren geben. Die Aktionsspektren für die Phototaxis der *Euglena gracilis*, die BÜNNING und SCHNEIDERHÖHN (1956), GÖSSEL (1957) und DIEHN (1969a) veröffentlichten, weisen den blauen bis grünen Spektralbereich als wirksame Strahlung aus. Das steht weitgehend im Einklang mit den bisherigen Aktionsspektren für andere phototaktisch reagierende, eukaryontische Organismen.

Der Begriff Phototaxis wird hier benutzt, um eine Unterscheidung zwischen phobischer und topischer Reaktion zu vermeiden, da die Trennung dieser Reaktionen nicht von allen Autoren konsequent durchgeführt wird.

CHECCUCCI et al. (1974) haben nachgewiesen, daß Ansammlungen der Euglenen durch rote Strahlung hervorgerufen werden können. Auf Grund dieser Befunde gewinnen die länger zurückliegenden Ergebnisse von WOLKEN und SHIN (1958) und die Hinweise von SCHMIDT et al. (1972) an Bedeutung. CHECCUCCI et al. diskutieren ihre Befunde in Zusammenhang mit einer eventuellen aerotaktischen Reaktion.

Als mögliche Photorezeptorpigmente werden die Pigmentklassen der Carotinoide (GOODWIN, 1964; TOLLIN, 1969) und der Flavine (DIEHN, 1969b; DIEHN und KINT, 1970; CHECCUCCI, 1973) diskutiert, die hauptsächlich den phototaktisch wirksamen Spektralbereich absorbieren.

Für die Carotinoide spricht die mehrgipfelige Feinstruktur der Aktionsspektren im Blaubereich, während die Maxima im

UV-Bereich auf Flavine deuten, da sie sich nicht durch cis-Formen der Carotinoide erklären lassen. Denn bis heute konnte keine cis-Form aus phototaktisch reagierenden Organismen isoliert werden.

1970 konnte jedoch HAGER zeigen, daß bestimmte Zusammensetzungen verschiedener Lösungsmittel UV-Absorptionsbanden bei Carotinoiden entstehen lassen. Hinzu kommen die Befunde von HAGER und PERZ (1970), nach denen enzymgebundene Carotinoide UV-Absorptionsbanden besitzen.

Andererseits können Absorptionsspektren der Flavine Feinstrukturen aufweisen, wenn sie in lipophilen Lösungsmitteln gelöst sind.

SONG und MOORE (1974) sprechen sich gegen die Carotinoide als primäre Photorezeptorpigmente aus wegen der kurzen Lebenszeit der Singlet-Zustände und wegen des Fehlens der Fluoreszenz und Phosphoreszenz, die die für Energieübertragungen auf Effektorsysteme notwendigen Triplet-Zustände ausschließen. Ferner bilden die Carotinoide in Lösungen bei Raumtemperatur keine stabile, freie Radikale. DIEHN und KINT (1970) führten Hemmversuche mit Jodid durch, die die Hypothese der Flavoproteine stützen. Untersuchungen von SCHÖNBOHM (1967) und SEITZ (1970) zeigten, daß Jodid auch in die Dunkelreaktion und in die Photophosphorylierung eingreift. Diese Befunde schränken den Aussagewert der Hemmversuche mit Jodid ein.

Eingehender erörtern diese Gesichtspunkte HAUPT (1970) und BERGMANN et al. (1969) in Bezug auf ähnliche Probleme bei der Frage nach den Photorezeptorpigmenten des Photo-tropismus.

Heute werden meist die Flavine als Photorezeptorpigmente der Phototaxis bei Euglena angesehen. Die Arbeit von FRÖHLICH und DIEHN (1974) ergibt erste Ansatzpunkte für Vorstellungen einer Rezeptor-Effektor-Kette - ausgehend von Flavinen - innerhalb des phototaktischen Reaktionsablaufes.

2.) METHODISCHE FRAGEN

Die bislang vorliegenden Aktionsspektren, die mit verschiedenen Methoden ermittelt wurden - angefangen bei mikroskopische Beobachtungen bis hin zu Vergleichsmessungen optischer Dichteverhältnisse - können nicht als Aktionsspektren der reinen Photo-topotaxis der *Euglena gracilis* angesehen werden. Wie wir zeigen werden, haben alle bisherigen Untersuchungen an *Euglena* den prinzipiellen experimentellen Fehler, daß von den Meßverfahren her nicht einwandfrei zwischen Photo-phobotaxis und Photo-topotaxis unterschieden wurde. Alle bei *Euglena* eingesetzten Verfahren lieferten Ergebnisse, die sich aus phobischen und topischen Reaktionskomponenten zusammensetzen. Daß beide Reaktionen aber getrennt werden müssen, zeigte bereits BUDER (1917), als er für beide Reaktionen unterschiedliche Schwellenwerte fand.

Außerdem läßt sich häufig eine Überlagerung der phototaktischen durch photokinetische und aerotaktische Reaktionen nicht mit Sicherheit ausschließen.

Es war daher eine der wichtigsten Aufgaben dieser Arbeit, eine Methode zu verwenden, mit der tatsächlich nur die photo-topotaktische Reaktion gemessen wird.

A.) Meßmethoden

Zur Messung photo-topotaktischer Reaktionen bieten sich nach HAND und DAVENPORT (1970) im Prinzip zwei Methoden an:

- a.) "individual cell methods", bei denen das Verhalten einzelner Zellen untersucht wird.
- b.) "mass movement or population methods", bei denen das Verhalten ganzer Populationen registriert wird.

Die Vor- und Nachteile der einzelnen Meßmethoden und deren mögliche Fehlerquellen behandelt NULTSCH (1975) in Bezug auf phototaktische Untersuchungen ausführlich.

Deshalb soll hier nur auf die Verfahren eingegangen werden, die von unmittelbarer Bedeutung für phototaktische Untersuchungen an *Euglena gracilis* sind.

"Individual cell methods" wie z. B. die Systeme von FEINLEIB und CURRY (1967) und von DAVENPORT (1973), das nach dem Prinzip von HAND et al. (1965) arbeitet - in Verbindung mit gleichzeitiger Komputermanalyse -, sind für den Versuchseinsatz mit *Euglena gracilis* wenig geeignet. Die flachen Küvetten, die diese Untersuchungen erfordern, bedingen eine starke Reduzierung der freien Wegstrecke, die der *Euglena* in bestimmten Richtungen des Raumes zur Verfügung steht. Die Untersuchungen BRINKMANN'S (1968) in Kapillaren haben eindeutig gezeigt, welchen Einfluß die freie Wegstrecke auf die Bewegungsrichtung der *Euglena gracilis* hat. Dieser Einfluß kann durch Küvetten mit größerer Höhe ausgeschaltet werden. Solche Küvetten werden in den "Populationsmethoden" verwendet.

Alle Populationsmethoden, die zur Untersuchung der Phototaxis von *Euglena gracilis* eingesetzt wurden, sind von der Konzeption her nur für photo-phobotaktische Untersuchungen, und auch hierfür nur bedingt, geeignet. Sämtliche Versuchsanordnungen beruhen auf dem Prinzip der Lichtfalle, das von ENGELMANN (1882) zur Untersuchung phobischer Reaktionen entwickelt wurde.

Ausgehend von der Hypothese, daß die Phototaxis bei *Euglena* auf der Summation einzelner phobischer Reaktionen beruht, sah man für *Euglena* keine Notwendigkeit, die Phototaxis und die Photo-phobotaxis begrifflich und von der Versuchsanordnung her sauber zu trennen. Man faßt beide Reaktionen vereinfachend unter dem Oberbegriff Phototaxis zusammen. Solange die Hypothese jedoch nicht eindeutig bewiesen ist, darf bei *Euglena* die Phototaxis nicht gleichgesetzt werden mit der Photo-phobotaxis.

Die Meßdaten, die mit dem Lichtfallenprinzip gewonnen werden, können leicht zu Fehlinterpretationen führen, daß die von MAST (1911) erstmals aufgestellte Hypothese

nie in ihrer Aussage exakt überprüft werden kann. Die Ansammlungen der Euglenen in der Lichtfalle beruhen vorwiegend auf der Photo-phobotaxis. Photo-topotaktische Reaktionen werden durch das Streulicht ausgelöst, das durch die Euglenen in der Falle entsteht. Das Streulicht kann als Lichtquelle für photo-topotaktische Untersuchungen nicht benutzt werden, weil

- a.) seine Intensität nicht bestimmt werden kann, die sich mit der Zahl der Euglenen in der Falle ständig ändert
und
- b.) die Qualität des Streulichtes bei Weißlichtversuchen und Farblichtversuchen, bei denen ein größerer Spektralbereich eingesetzt wird, durch die Eigenabsorption der Organismen in der Falle verändert wird.

Photokinetische Effekte dürften bei *Euglena* nicht zu erwarten sein, obwohl sie per se nicht auszuschließen sind (vgl. CLAYTON 1957, 1964).

Deshalb fordert NULTSCH (1975), daß derartige Meßverfahren für photo-topotaktische Untersuchungen nicht eingesetzt werden sollen.

BÜNNING und SCHNEIDERHÖHN (1956) setzen in ihren Untersuchungen zur Phototaxis der *Euglena* das Lichtfallenprinzip ein.

Die Mindestintensität des Lichtes für den Beginn der Ansammlung der Euglenen in der Falle wurde als Maß der Reaktion genommen. Dabei konnte der Experimentator nicht zwischen phobischen Reaktionen (Falle) und topischen Reaktionen (Streulicht) unterscheiden. Weiterhin sind Meßgrößen, die durch subjektive Beobachtungen des Experimentators ermittelt werden, mit individuellen Fehlern behaftet.

Für das von WOLKEN und SHIN (1958) verwendete System zur Aufstellung eines Aktionsspektrums der Phototaxis von *Euglena gracilis* gilt mutatis mutandis das gleiche wie für das oben erwähnte Verfahren.

Der "Phototaxigraph" nach LINDES et al. (1965), den DIEM und TOLLIN in leicht modifizierten Ausführungen für ihre Arbeiten

Deshalb soll hier nur auf die Verfahren eingegangen werden, die von unmittelbarer Bedeutung für phototaktische Untersuchungen an *Euglena gracilis* sind.

"Individual cell methods" wie z. B. die Systeme von FEINLEIB und CURRY (1967) und von DAVENPORT (1973), das nach dem Prinzip von HAND et al. (1965) arbeitet - in Verbindung mit gleichzeitiger Komputernalyse -, sind für den Versuchseinsatz mit *Euglena gracilis* wenig geeignet. Die flachen Küvetten, die diese Untersuchungen erfordern, bedingen eine starke Reduzierung der freien Wegstrecke, die der *Euglena* in bestimmten Richtungen des Raumes zur Verfügung steht. Die Untersuchungen BRINKMANN'S (1968) in Kapillaren haben eindeutig gezeigt, welchen Einfluß die freie Wegstrecke auf die Bewegungsrichtung der *Euglena gracilis* hat. Dieser Einfluß kann durch Küvetten mit größerer Höhe ausgeschaltet werden. Solche Küvetten werden in den "Populationsmethoden" verwendet.

Alle Populationsmethoden, die zur Untersuchung der Phototaxis von *Euglena gracilis* eingesetzt wurden, sind von der Konzeption her nur für photo-phobotaktische Untersuchungen, und auch hierfür nur bedingt, geeignet. Sämtliche Versuchsanordnungen beruhen auf dem Prinzip der Lichtfalle, das von ENGELMANN (1882) zur Untersuchung phobischer Reaktionen entwickelt wurde.

Ausgehend von der Hypothese, daß die Phototaxis bei *Euglena* auf der Summation einzelner phobischer Reaktionen beruht, sah man für *Euglena* keine Notwendigkeit, die Phototaxis und die Photo-phobotaxis begrifflich und von der Versuchsanordnung her sauber zu trennen. Man faßt beide Reaktionen vereinfachend unter dem Oberbegriff Phototaxis zusammen. Solange die Hypothese jedoch nicht eindeutig bewiesen ist, darf bei *Euglena* die Phototaxis nicht gleichgesetzt werden mit der Photo-phobotaxis.

Die Meßdaten, die mit dem Lichtfallenprinzip gewonnen werden, können leicht zu Fehlinterpretationen führen, daß die von MAST (1911) erstmals aufgestellte Hypothese

nie in ihrer Aussage exakt überprüft werden kann. Die Ansammlungen der Euglenen in der Lichtfalle beruhen vorwiegend auf der Photo-phobotaxis. Photo-topotaktische Reaktionen werden durch das Streulicht ausgelöst, das durch die Euglenen in der Falle entsteht. Das Streulicht kann als Lichtquelle für photo-topotaktische Untersuchungen nicht benutzt werden, weil

- a.) seine Intensität nicht bestimmt werden kann, die sich mit der Zahl der Euglenen in der Falle ständig ändert
und
- b.) die Qualität des Streulichtes bei Weißlichtversuchen und Farblichtversuchen, bei denen ein größerer Spektralbereich eingesetzt wird, durch die Eigenabsorption der Organismen in der Falle verändert wird.

Photokinetische Effekte dürften bei *Euglena* nicht zu erwarten sein, obwohl sie per se nicht auszuschließen sind (vgl. CLAYTON 1957, 1964).

Deshalb fordert NULTSCH (1975), daß derartige Meßverfahren für photo-topotaktische Untersuchungen nicht eingesetzt werden sollen.

BÜNNING und SCHNEIDERHÖHN (1956) setzen in ihren Untersuchungen zur Phototaxis der *Euglena* das Lichtfallenprinzip ein.

Die Mindestintensität des Lichtes für den Beginn der Ansammlung der Euglenen in der Falle wurde als Maß der Reaktion genommen. Dabei konnte der Experimentator nicht zwischen phobischen Reaktionen (Falle) und topischen Reaktionen (Streulicht) unterscheiden. Weiterhin sind Meßgrößen, die durch subjektive Beobachtungen des Experimentators ermittelt werden, mit individuellen Fehlern behaftet.

Für das von WOLKEN und SHIN (1958) verwendete System zur Aufstellung eines Aktionsspektrums der Phototaxis von *Euglena gracilis* gilt mutatis mutandis das gleiche wie für das oben erwähnte Verfahren.

Der "Phototaxigraph" nach LINDES et al. (1965), den DIEM und TOLLIN in leicht modifizierten Ausführungen für ihre Arbeiten

zur Phototaxis der *Euglena* verwendeten, schalten den Experimentator als "Meßinstanz" aus. Ein Photomultiplier registriert fortlaufend mittels eines gekoppelten Schreibersystems die Ansammlung der Organismen in einer Lichtfalle.

CHECCUCCI et al. (1974) stellen fest, daß die von ihrer Apparatur, die nach dem Prinzip des "Phototaxigraphen" arbeitet, aufgezeichneten Reaktionskurven - den Taxigrammen - nicht hervorgeht, ob eine phobische oder eine topische Reaktion zur Ansammlung der *Euglenen* in der Lichtfalle geführt hat. Daher ist es nicht möglich, die bisher vorliegenden Aktionsspektren zur Interpretation der phobischen bzw. topischen Phototaxis der *Euglena gracilis* heranzuziehen.

Zwei Versuchsanordnungen, die nur photo-topotaktische Reaktionen messen, sind von FEINLEIB und CURRY (1967) und THROM (1968) beschrieben worden. Für die Untersuchung des photo-topotaktischen Verhaltens von *Euglena gracilis* wurden sie noch nicht benutzt.

Bei dem Verfahren nach FEINLEIB und CURRY fällt das Locklicht auf die Stirnseite der runden, horizontal gelagerten Reaktionsküvette. An zwei Punkten der Küvettenlängsachse wird die Populationsdichte photometrisch festgestellt. Die Verschiebung der optischen Dichte innerhalb der Küvette infolge der photo-topotaktischen Bewegung der Organismen wird als Differenzanzeige zwischen den beiden Meßstellen über eine Brückenschaltung kontinuierlich mit einem Schreiber aufgezeichnet. Durch diese Versuchsanordnung ist eine phobische Reaktion ausgeschaltet.

Während des Versuches rotiert die Küvette um ihre Längsachse und verhindert eine Sedimentation der Organismen.

Da das Locklicht parallel zur Längsachse der Küvette verläuft, entsteht innerhalb der Küvette ein Lichtgradient, dessen Größe abhängig ist von der Anzahl der Organismen pro ml und deren Eigenabsorption. Die Intensitätsunterschiede des Locklichtes in verschiedenen Bereichen der Küvette können dazu führen, daß die Organismen in dem vorderen Küvettenabschnitt negativ reagieren, dagegen positiv im hinteren Küvettenteil.

Der Lichtgradient führt weiterhin zu einer unterschiedlichen Photosyntheserate bei photosynthetisch aktiven Organismen. Es entstehen dadurch weitere chemische Gradienten - z. B. der Sauerstoffgradient -, die die Reaktionen der Organismen beeinflussen können.

Die Rotation der Küvette um ihre Längsachse hat zur Folge, daß sich konzentrisch zur Mittelachse verlaufende Strömungsprofile ausbilden. Diese Kräfteverhältnisse ihrerseits beeinflussen die Bewegung der Organismen. Der Einfluß ist um so stärker, je größer die Angriffsfläche des Organismus ist. Sie ist um so größer, je mehr das Verhältnis von Längsachse zu Quersachse des Organismus von 1 abweicht.

Bei photo-topotaktischen Untersuchungen bedeutet das, daß *Euglena* eine stärkere Vororientierung ihrer Längsachse parallel zur Küvettenlängsachse erfährt als *Chlamydomonas*.

Die tatsächlich vorliegenden Verhältnisse bei den einzelnen Organismen sind noch unübersichtlicher, da bei dieser Betrachtung unter anderem die artspezifischen Bewegungsabläufe der Organismen vernachlässigt wurden.

Bei dem von THROM entwickelten System, das von NULTSCH et al. (1971) verbessert und ausgebaut wurde, wird eine eckige Küvette in einem Winkel von 45° zum Locklicht exponiert. Das Prinzip der photometrischen Vergleichsmessung zwischen zwei Meßpunkten an der Küvette ist ähnlich gelöst wie in dem System nach FEINLEIB und CURRY.

Die Küvettenanordnung macht den Lichtgradienten innerhalb der Küvette sehr gering. Dadurch wird eine mögliche Aufspaltung in positiv und negativ oder indifferent reagierende Organismen innerhalb verschiedener Küvettenbereiche ausgeschaltet.

Die Photosynthese kann keinen chemischen Gradienten aufbauen, wenn die Abmessungen der Küvette nicht zu groß sind. Chemotaktische Reaktionen werden so verhindert.

Die Strecke zwischen der Vorderseite und der Hinterscite der Kuvette, die einen Winkel von 45° mit der Kuvettenbreitseite bildet, legt bei dieser Anordnung die Wegstrecke fest, die die Organismen gradlinig auf die Lichtquelle zu schwimmen können. Die kurze Strecke reicht nicht aus, eine genügend große Differenz der optischen Dichte über den weit auseinanderliegenden Meßstellen aufzubauen. Deshalb ist dieses Meßsystem nur einzusetzen, wenn sich die Organismen umorientieren, sobald sie an der dem Locklicht zugekehrten Kuvettenseite ankommen (bei positiver Reaktion, bei negativer gilt entsprechendes für die Rückwand). Diese mechanische Umorientierung ist bei den einzelnen Organismen je nach Größe und Fortbewegungsart durch die Kuvettenwand verschieden stark behindert. Thigmotaktische Phänomene können nicht in allen Fällen ausgeschlossen werden.

Sedimentationen und "Musterbildungen" durch Dichteunterschiede in Massenkulturen von Mikroorganismen (MULTSCH und HOFF, 1973) können in der festliegenden Kuvette auftreten. Die Erscheinungen verhindern in manchen Fällen die notwendige Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse.

Die Vor- und Nachteile beider Meßsysteme sind in der folgenden Tabelle kurz zusammengestellt:

System I	= Meßanordnung nach FEINLEIB und CURRY (1967)
System II	= Meßanordnung nach THROM (1968), MULTSCH et al. (1971).

Tabelle:

System I	System II
rein topische Reaktion	rein topische Reaktion
Lichtgradient	kein Lichtgradient
chemischer Gradient	kein chemischer Gradient
keine Sedimentation	Sedimentation möglich
Unterdrückung der Musterbildung	Musterbildung ist möglich
keine Umorientierung an der Küvettenwand	Umorientierung an der Küvettenwand
Vororientierung der Organismen	Keine Vororientierung der Organismen.

Wie ersichtlich, gibt es kein für alle Organismen gleichermaßen geeignetes Meßsystem.

Wegen der Musterbildungen in Massenkulturen von *Euglena gracilis* (NULTSCH und HOFF, 1973) und der Sedimentationserscheinungen wurde das System I nach FEINLEIB und CURRY ausgewählt zur Untersuchung der Photo-topotaxis von *Euglena gracilis*. Die rotierende Küvette verhindert neben der Sedimentation vor allem die störende Musterbildung.

NULTSCH et al. (1971) konnten durch Kopplung der Meßapparatur mit einer homokontinuierlichen Kulturanlage bei Arbeiten zur Photo-topotaxis mit *Chlamydomonas reinhardtii* eine bislang unerreichte Standardisierung des Versuchsmaterials und der Versuchsdurchführung erreichen. Eine derartige Standardisierung für phototaktische Untersuchungen wurde bei *Euglena gracilis* noch nicht durchgeführt. Deshalb war unser erstes Ziel, eine Versuchsanlage nach FEINLEIB und CURRY mit einer automatisch gesteuerten Kulturanlage zu koppeln.

Dazu konnte jedoch nicht das Kulturumlaufsystem von NULTSCH et al. (1971) übernommen werden, da die Euglenen die mechanische Beanspruchung durch die Schlauchpumpe nicht überstanden.

B.) Die neu entwickelte Versuchsanordnung

Der Aufbau der Versuchsanordnung ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Die automatische Verdünnung für die homokontinuierliche Kultur arbeitet nach dem Prinzip des Turbidostaten (PFFENNIG und JANNASCH, 1962) unter photoelektrischer Kontrolle der Zellkonzentrationen (SENGER et al. 1972).

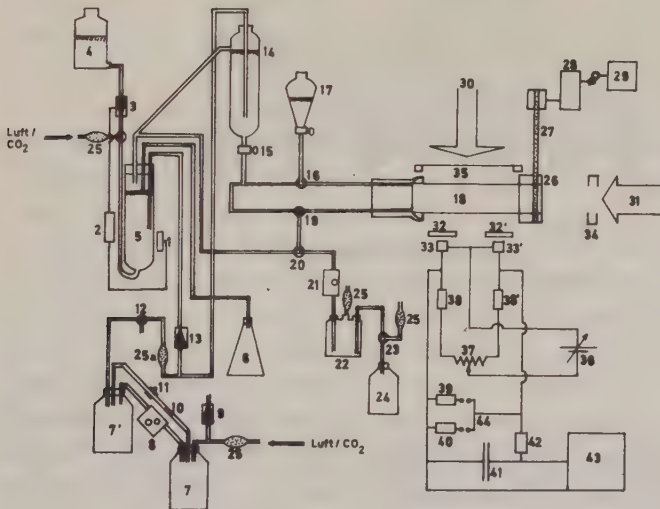


Abb. 1: Schema der Versuchsanordnung

- 1 Photozelle, 2 Regler, 3 Ventil, 4 Vorratsgefäß, 5 Kulturröhre, 6 Sammelgefäß, 7, 7' Windkessel (5 l Glasflaschen), 8 Kompressionspumpe, 9 Unterdruckventil, 10 Bunsenventil, 11 Klemmschraube, 12 Dreiwegehahn, 13 Ventil, 14 Vorflutgefäß, 15 Hahn des Vorflutgefäßes, 16 Dreiwegehahn, 17 Schütteltrichter, 18 Küvette, 19 Dreiwegehahn, 20 Dreiwegehahn, 21 Schlauchpumpe, 22 Zwischenflutgefäß, 23 Dreiwegehahn, 24 Abwasserflasche, 25, 25a Glasoliven (mit Watte gefüllt), 26 Kugellager, 27 Keilriemen, 28 Untersetzungs, 29 Elektromotor, 30 Meßlicht (RGN9-Filter), 31 Locklicht, 32, 32' RGN9-Filter, 33, 33' Photowiderstände, 34 Filterhalter, 35 Papierlage, 36 Philipsnetzgerät (Typ PE 4818), 37 Drehwiderstand (5 K Ω), 38, 38' Widerstände (50 K Ω), 39 Widerstand (100 Ω), 40 Widerstand (5 K Ω), 41 Kondensator (6,8 μ F), 42 Widerstand (100 K Ω), 43 Schreiber (Micrograph Typ BD5, Kipp & Zonen), 44 Mehrfachschalter.

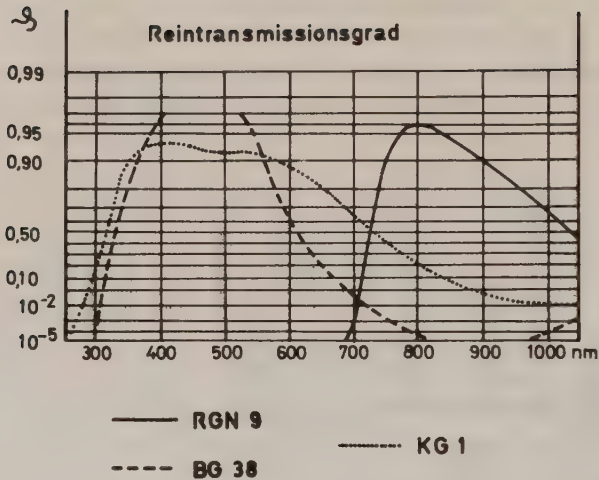


Abb. 1a: Kennlinien der Filter, die in der Apparatur (Abb. 1) eingebaut sind bzw. für die Untersuchung der Intensitätsabhängigkeit der Photo-topotaxis benutzt wurden. (Nach: Farb- und Filterglas für Wissenschaft und Technik, Jena'er Glaswerk - Schott & Gen, Mainz, Abt.: Physikalische Optik, Ausgabe 1970).

Das Luft-CO₂ Gemisch tritt von unten in die Kulturröhre (5) ein. Die Luftzufuhr wird so gesteuert, daß der Abstand der etwa 1 cm großen Gasblasen 15 cm beträgt. Die langsam aufsteigenden Gasblasen reichen aus, den CO₂-Partialdruck konstant zu halten und eine genügend große Turbulenz zu erzeugen, so daß jede Einzelzelle in den gleichen mittleren Lichtgenuß kommt. Das überschüssige Gas entweicht über ein mit einem lockeren Wattestopfen verschlossenes Sammelgefäß (6).

Aus der Kulturröhre wird ein Teil der Kultur ständig über ein Glasventil (13) abgehebert und durch Gasdruck in das Vorflutgefäß (14) gepumpt. Dabei wird ein Höhenunterschied von 150 cm überwunden.

Für den konstanten Gasdruck, der die Pumpmechanik unterhält, ist der Einsatz zweier Gasflaschen (5 Liter Inhalt) als Windkessel erforderlich (7,7'). In die erste Flasche strömt das Gasgemisch ein, das eine Kompressoranlage liefert, die mit größeren Druckschwankungen arbeitet. Eine Kompressionspumpe (8) saugt das Gemisch aus dem ersten Windkessel (7) an und gibt das neu komprimierte Gas an den zweiten Windkessel (7') ab. Dieser ist mit dem ersten über einen Schlauch mit Bunsenventil (10) und Klemmschraube (11) kurzgeschlossen. Mit der Klemmschraube kann der Druck in 7' nochmals reguliert werden, und das überschüssige Gas kann ohne Verlust nach 7 zurückströmen. Dieses Recycling-Verfahren hält den Gasverbrauch aus der Kompressoranlage gering. Das Bunsenventil (10) gleicht im ersten Windkessel (7) eventuell auftretende Druckanstiege aus. Der erste Windkessel seinerseits besitzt ein Unterdruckventil (9), das sich bei starkem Druckabfall öffnet. So kann die Pumpe (8) zusätzlich Raumluft ansaugen. Nur so ist es möglich, durch einen konstanten Gasdruck die erforderliche Pumpleistung für Monate zu gewährleisten. Schon ein kurzzeitiges Absinken des Gasdruckes unterbricht die Pumpmechanik. Dies würde in kurzer Zeit zum Absterben der Kultur in dem Vorflutgefäß (14) führen.

Das komprimierte Gasgemisch strömt dann durch eine mit Watte gefüllte Glasolive (25a), die das Gas von Keimen befreit, zum Vorflutgefäß (14). Eine Feinregulierung des Gasstromes ist an dem Dreiwegehahn (12) möglich, der bei Inbetriebnahme der Anlage das erstmalige Ansaugen der Kulturflüssigkeit aus der Kulturröhre (5) ermöglicht. Die angesaugte Algensuspension strömt bis zu dem Ventil (13), das durch den hydrostatischen Druck verschlossen wird. Der Gasdruck auf der anderen Seite des Ventils steigt an. Wird er größer als der hydrostatische Druck der Kultur, öffnet sich das Ventil.

Es fließt solange Kulturmedium durch das Ventil, bis der hydrostatische Druck wieder größer ist als der Gasdruck. Das Ventil wird erneut geschlossen. Das Kulturmedium, das das Ventil passiert hat, wird durch das Gasgemisch in das Vorflutgefäß (14) transportiert.

Aus dem Wechselspiel der Druckverhältnisse und der Ventilmechanik ergibt sich ein rhythmischer Transport des Kulturmediums aus der Kulturröhre (5) in das Vorflutgefäß (14). Dabei dient das "Pumpgas" gleichzeitig zur Begasung des Vorflutgefäßes. Durch den Überlauf des Vorflutgefäßes strömt das überschüssige Gas und die Euglenensuspension zurück in die Kulturröhre (5).

Der Gasstrom im Vorflutgefäß wird mit dem Dreiwegehahn (12) so reguliert, daß durch die Transporttätigkeit des Gasgemisches 50 ml Kulturflüssigkeit in 8 Minuten aus der Kulturröhre in das 200 ml fassende Vorflutgefäß transportiert werden. Der Innendurchmesser des Verbindungsschlauches aus Silikon beträgt 0,5 cm. (An dieser Stelle sei vermerkt, daß alle in der Apparatur verwendeten Schlauchverbindungen aus Silikon sind).

Die genaue Einstellung der Begasung ist erforderlich, da bei zu starker Begasung die Euglenen infolge zu großer Turbulenzen ihre Geißeln abwerfen. Sie vermehren sich dann im Palmellastadium weiter und sind für Versuche unbrauchbar. Bei zu geringer Begasung hingegen, ist der mittlere Lichtgenuß der Euglenen in dem Vorflutgefäß (14) zu gering für die notwendige Wachstumsrate der Kultur. Zusätzlich wird der Austausch mit der stärker beleuchteten Kulturröhre (5) verlangsamt. Wenn eine Kultur unter unseren Versuchsbedingungen einmal die Geißeln abgeworfen hat, so dauert es bis zu zwei Wochen, ehe die Zellen ihre volle Beweglichkeit wieder erlangen. Mit steigender Zellzahl der Kultur nimmt die Absorption der Strahlung zu, die auf die Photozelle (1) fällt. Ist ein bestimmter Absorptionswert erreicht, so öffnet sich das Magnetventil (3). Aus dem Vorratsgefäß (4) fließt neues Nährmedium über das Begasungsrohr in die Kulturröhre (5), in der es sich schnell mit der Kultur mischt.

Infolge des im System herrschenden Überdruckes wird eine entsprechende Menge der Euglenensuspension in das Sammelgefäß (6) gedrückt. Hat die optische Dichte der Suspension durch die Verdünnung den Sollwert erreicht, so schließt sich das Magnetventil (3).

Der direkte Anschluß der Meßküvette an die homokontinuierliche Kultur erfordert eine besondere Konstruktion.

Als Reaktionsgefäß dient eine Rundküvette (18) von 10 cm Länge und 2,5 cm Außendurchmesser mit einem Kugelnormschliff 535/20. Das Schliffgegenstück ist als Halterung gearbeitet, in dem sich die Küvette dreht. Die Halterung ist durch einen Teflonpflock verschlossen, der mit zwei Gummidichtungen in dem Glasstutzen festgeklemmt ist. Durch den zweifach durchbohrten Teflonstopfen ist die Meßküvette mit dem Vorflutgefäß (14) und der Kulturröhre (5) verbunden. Die Küvette läuft mit ihrem Vorderende in einem Kugellager (26). Ein Elektromotor (29) treibt mit einem Keilriemen die Küvette über eine zwischengeschaltete Unter-
setzung (28) an, die es ermöglicht, verschiedene Rotationsgeschwindigkeiten einzustellen. Das Locklicht (31) wird von einer Xenonhochdrucklampe geliefert: Typ XBO 2500 W der Firma Osram in einem Brennergehäuse der Firma Zeiss Ikon der Bauserie Xenosol III Typ 23-27. Der Strahlengang wird durch Linsensysteme und Blenden korrigiert. Das nach der Korrektur nahezu vollständig parallel verlaufende Licht trifft frontal auf die Küvette. Strahlungsenergie unerwünschter Spektralbereiche wird durch Kaltlichtspiegel, KG1 Filter und Kantenfilter der Firma Schott & Gen / Mainz eliminiert. Dazu werden die Filter im Strahlengang in eine Wasserküvette eingesetzt, die von Wasser konstanter Temperatur (18°C) durchströmt wird.

Vor der Versuchsküvette (18) befindet sich der Filterhalter (34) für die Interferenzfilter und andere Filtergläser, die die Qualität des Locklichtes bestimmen.

Ein starker Ventilator kühlt die Filter.

Zu Beginn einer Versuchsreihe muß alle Luft aus der Küvette durch die Algenkultur verdrängt werden. Wenn bei richtiger Einstellung der Dreiwegehähne (16), (19), (20) der Schliffhahn (15) des Vorflutgefäßes geöffnet wird, strömt die Kultur unter Verdrängung der Luft durch die Küvette (18) in die Kulturröhre (5) zurück. Dann wird der Hahn des Vorflutgefäßes geschlossen und die Küvettenapparatur zum Meßlicht (30) und Locklicht (31) justiert. Bei allen weiteren Versuchen muß nur noch der Hahn des Vorflutgefäßes solange geöffnet werden, bis jeweils etwa 50 ml Algenkultur die Versuchsküvette durchströmt haben. So läßt sich eine stets gleichbleibende Zellverteilung vor jedem Test erreichen. Luftblasen werden aus dem Vorflutgefäß nicht mitgerissen. Der Einlaufstutzen, durch den - wie bereits erwähnt - die Begasung dieses Teils der Kultur erfolgt, erreicht nur etwa $\frac{2}{3}$ der Tiefe des Vorflutgefäßes. Starke Turbulenzen im verbleibenden Drittel des Vorflutgefäßes sorgen für eine ständige Durchmischung.

Die Verteilung der Organismen in der Reaktionsküvette wird photometrisch durch Messung der optischen Dichte an zwei Stellen der Küvettenlängsachse erfaßt. Für diesen Zweck sind zwei Photowiderstände (33, 33') in 6 cm Abstand parallel zum einfallenden Locklicht unter die Küvette montiert.

Ein Prado-Universal-Projektor der Firma Leitz/Wetzlar, ausgerüstet mit einer Halogenlampe 24V/250 W, liefert das Meßlicht. In seiner Dia-Führung befindet sich ein RGN 9 Filter. Das Meßlicht fällt von oben auf die Küvette. Das parallel verlaufende Meßlicht wird, bevor es auf die Küvette (18) trifft, durch eine Lage Papier gestreut. Auf diese Weise wird der Linseneffekt der Küvette weitgehend ausgeschaltet.

Die Photowiderstände unter der Küvette sind mit RGN 9 Filtern abgedeckt, um gestreutes Locklicht zu absorbieren.

Die zwei Photowiderstände (33, 33') sind Bauelemente einer Wheatstoneschen Brückenschaltung. Zum Abgleich der Widerstände dient ein 5 k Ω Drehwiderstand (37). Den Photowiderständen ist jeweils ein 50 k Ω Widerstand (38, 38') vorgeschaltet, damit die Empfindlichkeit der Photowiderstände in den weitgehend linearen Arbeitsbereich verschoben werden. Ein Philips-Netzgerät Typ PE 4818 (36) versorgt die Brücke mit 12 V Gleichspannung. Über zwei zwischenschaltbare Widerstände (39, 40) von 100 Ω und 5 k Ω zur Ausweitung des Empfindlichkeitsbereiches ist die Brücke an einen automatischen Schreiber, den Kipp & Zonen-Micrograph Typ BD 5 gekoppelt. (43) Dieser registriert die Spannungsschwankungen in der Brücke. Um kurzzeitige Schwankungen zu eliminieren, ist ein Kondensator von 6,8 μ F (100 V) WIMA MKS (41) mit einem Vorwiderstand von 100 k Ω (42) dem Schreibereingang vorgeschaltet.

Nach Beendigung einer Meßreihe wird der Dreiwegehahn (16) so eingestellt, daß das Meßsystem über den Schütteltrichter (17) mit der Raumluft in Verbindung steht. Bei entsprechender Schrägstellung der Apparatur fließt die Algenkultur bis auf einen kleinen Rest in die Kulturröhre (5) zurück.

Zur Reinigung der Meßküvette wird steriles Wasser aus dem Schütteltrichter (17) mit der Schlauchpumpe (21) durch die Küvette gepumpt und in dem Zwischenflutgefäß (22) aufgefangen. Von dort wird es in die Abwasserflasche (24) abgehebert.

Bis zu diesem Zwischenflutgefäß (22) kann die Apparatur steril gehalten werden. Wir haben keine Fremdinfectionen festgestellt, obwohl bei einer Betriebsdauer von mehreren Wochen und Monaten Kontaminationen durch andere Mikroorganismen nicht ausgeschlossen werden können.

3.) VERSUCHE ZUR PHOTO-TOPOTAXIS

A.) Material und Methodik

Versuchsobjekt

.....

Für die photo-topotaktischen Versuche wurde *Euglena gracilis* Stamm (A) 1224-5/1 aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Göttingen verwendet (KOCH, 1964).

Anzuchtbedingungen

.....

a.) Anzucht und Weiterzucht der Stammkulturen.

Zur Anzucht und Weiterzucht in Stammkulturen wurde das Medium nach GROSS, JAHN und BERNSTEIN (in: GÖSSEL, 1957) wie folgt modifiziert:

Pepton	2,5 g
Glukose	1 g
Natriumacetat	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
Bacto-Hefe-extrakt	0,1 g

auf einen Liter Wasser.

Die Stammkulturen wurden in Reagenzgläsern mit je 10 ml Nährlösung gehalten und in dreiwöchigen Abständen weitergeimpft.

b.) Anzucht in der homokontinuierlichen Kulturanlage.

Da das oben angegebene Medium sehr anfällig für Fremdinfectionen ist - vor allem durch Pilze und Bakterien -, wurde für die Anzucht in der homokontinuierlichen Versuchsanlage des Mediums nach CRAMER und MYERS (1952) benutzt, das während der Voruntersuchungen einige Abänderungen erfuhr.

Das Medium hat folgende Bestandteile:

$(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$	1	g
KH_2PO_4	1	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	g
NaNO_3	0,4	g
Ca Cl_2	0,02	g
Titriplex II	0,025	g

auf einen Liter Wasser.

Als Spurenelemente kommen hinzu:

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3	mg
$\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,8	mg
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,3	mg
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	mg
$\text{H}_2\text{Mo O}_4$	0,2	mg
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,02	mg.

An kalt sterilisierten Vitaminen werden nach dem Autoklavieren der übrigen Nährlösung zugesetzt:

Thiaminhydrochlorid	0,02	mg
B_{12} (Merck Cobione)	0,001	mg

bezogen auf einen Liter Nährlösung.

Die homokontinuierliche Kultur erfolgte in einem Lichtthermostaten (KUHLE und LORENZEN, 1964). Als Beleuchtung diente eine Kombination von Leuchtstoffröhren der Firma Osram mit den Typenbezeichnungen 40 W/25-1 und 40 W/15-1 im Verhältnis 1 : 1.

Das Vorflutgefäß (vgl. Beschreibung der Versuchsanordnung, Abb. 1) wurde mit einer 15 W Osramglühlampe beleuchtet. Die Beleuchtungsstärke der Kulturröhren betrug 2000 Lux. Die Glühbirne lieferte für das Vorflutgefäß 500 Lux.

Die Kulturen wurden homokontinuierlich gezogen, um tagesperiodische Änderungen des phototaktischen Verhaltens auszuschließen, die POHL (1948) und BRINKMANN (1966) nachweisen konnten.

Da nach Untersuchungen von DIEHN (1973) und TOLLIN (1973) eine optimale phototaktische Reaktionsbereitschaft bei *Euglena* nur in einem Licht-Dunkelwechsel von 12 zu 12 Stunden zu erreichen ist und die phototaktische Reaktion bei Dauerlicht fast ganz verschwindet, wurden die Kulturen im Vorflutgefäß nur mit 500 Lux beleuchtet. Dadurch wurde die Kultur an die Grenze ihrer Existenzmöglichkeit gedrückt. Unter diesen Bedingungen zeigte sie wieder ausreichend große Reaktionen für photo-topotaktische Untersuchungen.

Die Temperatur im Lichtthermostaten betrug $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Die gleiche Temperatur hatte der Versuchsraum, in dem die Apparatur aufgestellt war.

Zur Begasung der Kulturen wurde die Luft in der Kompressoranlage mit 2 Vol. % CO_2 versetzt.

Die homokontinuierliche Kultur wurde durch den Regler (2) und die Photozelle (1) so gesteuert, daß ständig eine Zellzahl von 3×10^5 *Euglenen*/ml vorlag (vgl. Abb. 1).

Die optimale Kulturdichte in Bezug auf die photo-topotaktische Reaktionsgröße der vorgegebenen Versuchsanordnung mußte empirisch ermittelt werden.

Wegen der Länge der Versuchsküvette und der Frontalausrichtung zum Locklicht ergab sich ein mehr oder minder starker Lichtgradient, der durch eine möglichst kleine Zellzahl/ml gering gehalten werden mußte.

Andererseits konnte die Kultur nicht zu dünn angezogen werden, da dann das Signal der Reaktion zu klein wurde, weil die Dichteunterschiede über den Photowiderständen einen zu geringen Wert erreichten. Ferner war die Dichte der Kultur bestimmend für den mittleren Lichtgenuß der Einzelzellen und damit von größter Bedeutung für die Reaktionsbereitschaft der Euglenen.

Für den Start der homokontinuierlichen Kultur wurden statische Kulturen verwendet, die bereits in anderen Kulturröhren bis fast zur gewünschten Zellzahl herangewachsen waren. Es gelangten nur Kulturen zum Versuchseinsatz, die mindestens zwei Wochen unter Bedingungen der homokontinuierlichen Kultur gewachsen waren. Diese Zeit verging, bis eine gleichmäßige Verdünnungsrate anzeigte, daß die homokontinuierliche Kultur ihr Gleichgewicht in Bezug auf die Zusammensetzung der Euglenenpopulation erreicht hatte.

c.) Anzucht für Hemmstoffversuche.

Die Euglenen der homokontinuierlichen Kultur wurden nach Zusatz von DCMU (3(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) unbeweglich. Deshalb wurden die Euglenen mixotroph in dem Medium nach GROSS et al. (in: GÖSSEL, 1957) bei 2000 Lux Dauerlicht und 25°C in Kulturröhren ohne automatische Verdünnung und Umpumpmechanismus angezogen. In den mixotrophen Kulturen bildeten die Euglenen große Paramylumkörner. Nach 14 Tagen wurden die Zellen abzentrifugiert und in dem abgeänderten Medium nach CRAMER und MYERS (1952) resuspendiert.

In diesem Medium ergrüntten die gelblichen Organismen innerhalb von drei Tagen. Sie erreichten die gleiche Photosyntheserate wie die in der homokontinuierlichen Anlage angezogenen, bevor sie für Versuche eingesetzt wurden.

d.) Anzucht für Untersuchungen zur negativen Phototaxis.

Die bisher dargestellten Anzuchtverfahren lieferten Euglenakulturen, die im gesamt sichtbaren Spektralbereich positiv phototaktisch reagierten.

Um negativ reagierendes Material zu erhalten, wurden die Euglenen für zwei Wochen mixotroph bei 2000 Lux in Kulturröhren bei 25° C in dem Medium nach GROSS et al. (in: GÖSSEL, 1957) gezogen. Dann wurden sie abzentrifugiert und entsprechend der gewünschten Zellzahl/ml in dem Versuchsmedium nach BRINKMANN (1966) resuspendiert. In diesem Medium findet nach BRINKMANN (1966) keine Zellvermehrung mehr statt. Durchgeführte Zellzahlbestimmungen bestätigten diese Aussage.

Das Versuchsmedium besteht aus:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1	g
KH_2PO_4	0,5	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	g

auf 1 Liter Wasser.

Unter Beibehaltung der übrigen Anzuchtbedingungen hatten sich die Euglenen innerhalb von drei Tagen an das neue Medium adaptiert. Sie reagierten nur negativ.

B.) Versuchsdurchführung und Auswertung

Bei den Versuchen mit der neuen Meßapparatur (Abb. 1) zur Photo-topotaxis von *Euglena gracilis* mußte die Versuchsdurchführung den Gegebenheiten der Apparatur und den Eigenschaften der *Euglena* angepaßt werden.

Vor jeder Versuchsreihe wurde die Wheatstonesche Brücke mit dem Drehwiderstand (37) so abgeglichen, daß die Brücke stromlos war.

Die Rotationsgeschwindigkeit der Küvette betrug 7 Umdrehungen pro Minute. Sie reichte aus, sowohl die Musterbildung als auch die Sedimentation zu unterbinden.

Die großen Flagellaten, die mit hoher - für den Kulturaustausch notwendigen - Geschwindigkeit durch die Küvette flossen, bildeten Strömungsmuster. Diese Muster erzeugen wegen ihrer optischen Inhomogenität einen so starken Rauschpegel in den Aufzeichnungen des Micrographen, daß sie unbrauchbar sind. Chlorophyllextrakte mit gleicher optischer Dichte ergaben eine einwandfreie Baseline. Eine Minute nach Beendigung des Durchflusses war die Kultur jedoch durch die Küvettenrotation wieder homogen verteilt, so daß von diesem Zeitpunkt ab eine Aufzeichnung der phototopotaktischen Reaktion möglich war. Das Locklicht und die Registrierung der Reaktion wurden deshalb erst eine Minute nach Beendigung des Durchflusses eingeschaltet. Die Änderung der Brückenspannung, die der Schreiber während der phototaktischen Reaktion registrierte, war den Veränderungen der optischen Dichte, die durch die photo-topotaktischen Reaktionen der *Euglenen* in der Küvette auftraten proportional. Bei der benutzten Schaltung ergab die positive Photo-topotaxis der *Euglenen* eine ansteigende Schreiberkurve. Die negative Reaktion wurde entsprechend als abfallende Kurve aufgezeichnet. Als Maß der Reaktion wurde der während der 2. und 3. Minute nach Beginn der Registrierung erreichte Schreiberausschlag gewählt.

Jeder Versuch dauerte mindestens 5 Minuten, jedoch wurde in der Regel die Reaktion für 7 Minuten registriert.

In Abb. 2 ist eine typische Reaktionskurve aufgezeichnet. Die Kurve zeigt die Effekte der Inhomogenität des Küvettenglases und der leichten Unwucht des Antriebes, die sich in den periodisch wiederkehrenden Zacken der Kurve manifestieren - die Messung jedoch in keiner Weise beeinträchtigen.

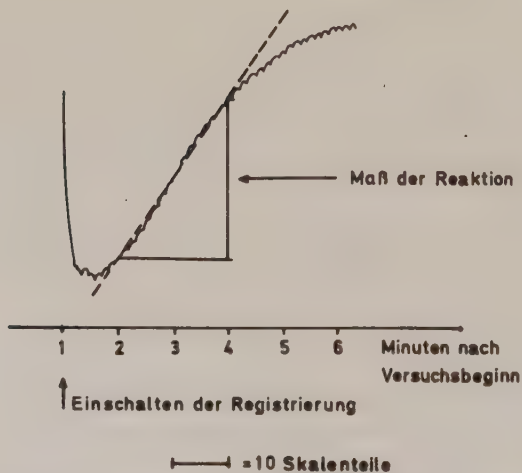


Abb. 2: Reaktionsaufzeichnungen der Photo-topotaxis bei 461 nm, $2,8 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$ im 2 mV-Bereich des Micrographen Typ BD5 (Kipp & Zonen)

C.) Charakterisierung des homokontinuierlich gezogenen Versuchsmaterials

Zur Charakterisierung der zum Versuchseinsatz gelangenden Euglenakulturen wurden folgende Parameter über einen 7 Wochen umfassenden Zeitraum getestet:

1.) Zellzahl/ml

Die Auszählung erfolgte in einer Zählkammer nach Thoma.

2.) packed cell volume

Zur Ermittlung des packed cell volume wurden 4 graduierte Kafka-Röhrchen mit 5 ml Euglenakulturen gefüllt und 5 Minuten bei 3000 upm zentrifugiert.

3.) Pigmentgehalt: Gesamtchlorophyll

Chlorophyll a

Chlorophyll b

Carotinoide

Zur Bestimmung des Pigmentgehaltes bezogen auf 25 ml Euglenakultur wurden die Gleichungen nach MAC KINNEY (1941) angewendet. Die heiß extrahierten Methanolproben wurden in 1 cm Küvetten im Spektralphotometer Zeiss PMQ II bei den erforderlichen Wellenlängen vermessen.

4.) relative Photosyntheserate

Als relatives Maß für die Photosynthese wurde die O_2 -Produktion polarographisch bestimmt. Dazu wurde der Gilson-Oxygraph (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin, Techmation Düsseldorf) verwendet, der mit einer Micro-Clark-Elektrode arbeitet. (SENGER, 1970).

Für die Messungen wurden die Euglenen abzentrifugiert und in 0,1 molarem Karbonat-Bikarbonat-Warburgpuffer Nr. 9 resuspendiert. Der pH-Wert dieses Puffers beträgt 9 (WARBURG, 1919).

5.) Größe der photo-topotaktischen Reaktion

Die Größe wurde in der bereits beschriebenen Weise bestimmt. Die Qualität des Locklichtes entsprach der Durchlässigkeit des BG 38 Filters und einer Lichtstärke von 5000 Lux (vgl. S. 29).

Die Bestimmungen wurden wöchentlich durchgeführt. Die erste Bestimmung wurde in der dritten Woche nach Beginn der homokontinuierlichen Kultur vorgenommen.

Der zeitliche Abstand von einer Woche zwischen den Messungen war erforderlich, da nur jede Woche 10 ml Kulturlösung aus dem System zusätzlich entnommen werden konnten. Wurde mehr Kulturmaterial aus dem Umlauf entzogen, so änderte sich das photo-topotaktische Reaktionsverhalten, die Pigmentzusammensetzung und die Photosyntheserate. Es entstanden Abweichungen von 20 % und mehr von den vorangegangenen Meßwerten. Die Ursache für diese Änderungen war die im Verhältnis zu dem vorhandenen Altmedium starke Zufuhr neuen Kulturmediums. Durch diese Verschiebungen wurde das empfindliche Populationsgleichgewicht der homokontinuierlichen Kultur verändert.

Die in Abb. 3 wiedergegebenen Kurven zeigen, daß die Euglenapopulation der homokontinuierlichen Kultur in ihrer Zellverteilung und ihrem physiologischen Zustand konstant ist.

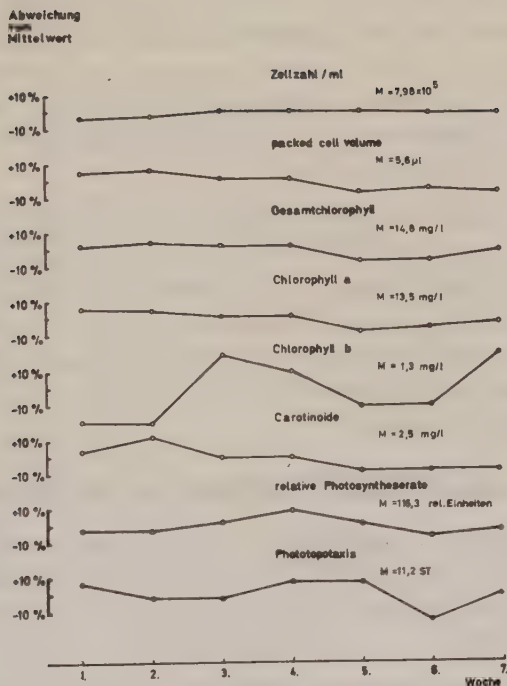


Abb. 3: Prozentuale Abweichung verschiedener Parameter von Mittelwert (100 %) einer homokontinuierlichen Kultur über einen Zeitraum von 7 Wochen.

Zu den Pigmentgehalten ist zu bemerken, daß die Gleichungen von MAC KINNEY bestimmte Verhältnisse von Chlorophyll a zu Chlorophyll b und den Carotinoiden voraussetzen, wie sie z. B. bei den Grünalgen vorliegen. Da *Euglena gracilis* jedoch bedeutend weniger Chlorophyll b besitzt, können Abweichungen von den realen Werten bei der Berechnung der Pigmentgehalte nicht ausgeschlossen werden. Da jedoch bei den vorliegenden Untersuchungen nicht die absoluten Pigmentgehalte von Bedeutung waren, sondern nur deren relative Konstanz überprüft werden sollte, konnte dieser Fehler vernachlässigt werden.

Die relativ großen Schwankungen des Chlorophyll b-Gehaltes beruhen auf experimentellen Fehlern. Der geringe Gehalt an Chlorophyll b (Chlorophyll a : Chlorophyll b = 10 : 1) z.B. führte zu größeren Ablesefehlern bei der photometrischen Bestimmung. Ferner multiplizierte sich dieser Fehler stärker bei der Berechnung des Chlorophyll b-Gehaltes als beim Chlorophyll a-Gehalt.

D.) Versuche zur Intensitätsabhängigkeit der Photo-topotaxis

Für die Versuche wurde ein BG 38 Filter verwendet (vgl. Kennlinien der Filter in Abb. 1a), so daß ein blau-grünes Locklicht entstand - ähnlich dem bei FEINLEIB und CURRY (1967).

Das Weißlicht der Xenonlampe konnte als Locklicht nicht verwendet werden, da es noch Anteile enthält, die die RGN 9 Filter auf den Photowiderständen nicht absorbieren. So konnte Streulicht am Vorderende der Küvette negative Reaktionen auf dem Schreiber vortäuschen, weil sich der Streulichtanteil durch die positiv photo-topotaktisch reagierenden Euglenen am Vorderende der Küvette vergrößerte. Je stärker die positive Reaktion ausfiel, desto größer war das Streulicht. Von einer bestimmten Dichte ab war seine Intensität so hoch, daß es die Lichtabsorption des Meßlichtes durch die Euglenen kompensierte. Deshalb täuschten die Signale der Photowiderstände auf dem Schreiber negative Reaktionen vor.

Mit dieser Versuchsanordnung wurden Versuche durchgeführt, um

- a.) die Brauchbarkeit der neuen Versuchsanordnung zu testen.
- b.) die Intensitätsabhängigkeit der Photo-topotaxis von *Euglena gracilis* zu untersuchen.

Es wurden die Reaktionsgrößen der Photo-topotaxis in Abhängigkeit von den Luxwerten im Bereich zwischen 100 Lux und 10^5 Lux ermittelt. Die Messung der Lichtintensität erfolgte in Lux, da die Transmissionskurve des BG 38 Filters ähnlich verläuft wie die Empfindlichkeitskurve des Luxmeters.)

Die Ergebnisse sind in Abb. 4 graphisch dargestellt.

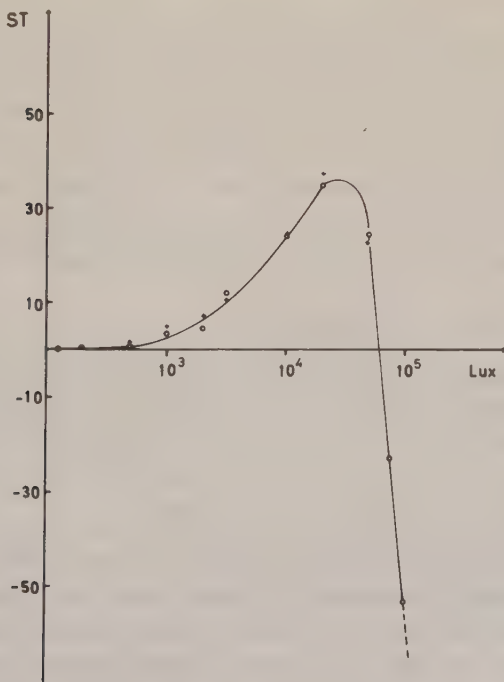


Abb. 4: Intensitätsabhängigkeit der Photo-topotaxis bei unpolarisiertem und polarisiertem Licht (BG38-Filter).
o-o-o- = unpolarisiertes Licht
+--+ = polarisiertes Licht

Der Verlauf der Dosis-Effekt-Kurve im negativen Bereich konnte nur bis 10^5 Lux festgestellt werden. Höhere Intensitäten konnten mit der benutzten Xenonlampe und dem BG 38 Filter nicht erreicht werden.

Die positive Reaktion erreichte bei etwa 4×10^4 Lux ihr Maximum, wurde dann wieder schwächer und änderte schließlich zwischen 5×10^4 und $7,5 \times 10^4$ Lux ihr Vorzeichen. Der Umschlagpunkt der Reaktion bei $6,3 \times 10^4$ Lux liegt auf der steil abfallenden Kurve oberhalb des Maximums der positiven Reaktion. Das kann als ein Zeichen für eine einheitliche Stimmung im Sinne STRASBURGERS (1878) gewertet werden, die durch die homokontinuierliche Anzucht der Euglenen erreicht wurde.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang noch folgende Feststellung:

Führte man die Versuche ohne BG 38 Filter durch und beobachtete den Reaktionsverlauf, so zeigte es sich, daß die Reaktion bereits zwischen 10^4 und $1,5 \times 10^4$ Lux ihr Vorzeichen änderte. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte der größere Rotlichtanteil des Locklichtes oberhalb von 700 nm sein, der eine entgegengesetzte Reaktion auslösen kann, wie die späteren Untersuchungen mit Farblight ergaben.

E.) Versuche mit polarisiertem Licht

BOUND und TOLLIN (1967) fanden bei Untersuchungen mit dem Phototaxigraphen, daß bei Verwendung von polarisiertem Licht die phototaktische Reaktion der Euglenen verschieden ausfällt, je nachdem ob das Licht senkrecht zu oder in Richtung der Längsachse der Euglena schwingt.

Deshalb führten wir ebenfalls Versuche mit polarisiertem Locklicht durch. Die Messungen ergaben einen etwa übereinstimmenden Kurvenverlauf zu der zuvor gemessenen Dosis-Effekt-Kurve (bis 50 000 Lux; höhere Intensitäten waren technisch nicht zu erreichen.), wie aus Abb. 4 ersichtlich ist.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Ergebnisse BOUND und TOLLIUS (1967) nicht mit der photo-topotaktischen Reaktion zusammenhängen, sondern das Resultat phobischer Reaktionen sind. Bei dem Phototaxigraphen trifft das polarisierte Locklicht seitlich auf die Euglenen, die durch die Rotation der Küvette vororientiert sind. Dadurch können unterschiedliche Strukturen der Pigmentanordnung etc. verstärkt angeregt werden, je nachdem ob die Strukturen bevorzugt quer oder längs zur Längsachse der Euglena angeordnet sind. Bei unserer Versuchsanordnung hingegen fällt das polarisierte Locklicht, je nach dem Vorzeichen der photo-topotaktischen Reaktion, entweder auf das Vorder- oder Hinterende der vororientierten Euglenen. Durch die Rotation der Küvette und vor allem durch die Eigenrotation der Euglena kann keine Struktur durch das polarisierte Licht bevorzugt angeregt werden, da alle Strukturen bei gleicher Luxzahl statistisch gesehen die gleiche Anzahl Quanten pro Zeiteinheit erhalten. Daraus läßt sich schließen, daß für rein photo-topotaktische Orientierungen bei *Euglena gracilis* kein unmittelbarer Zusammenhang zur Schwingungsebene des Lichtes besteht.

F.) Aktionsspektrum der Photo-topotaxis

Bei der Messung des Aktionsspektrums konnte mit der homokontinuierlichen *Euglena*-Kultur nicht länger als ca. 10 Stunden ununterbrochen gearbeitet werden. Danach mußte eine Pause von einem Tag eingelegt werden. Ohne diese Unterbrechung wirkten sich die Farblichtversuche als zusätzliche Vorbehandlung aus, die nicht zu standardisieren ist.

Die Energie des Locklichtes wurde mit der Thermosäule CH 1 der Firma Kipp & Zonen gemessen, die mit einem Null-Microvoltmeter, Typ MG 20 der Firma Knick/Berlin gekoppelt war. Die Messung erfolgte hinter dem Filterhalter (vgl. Abb. 1, 34).

Eine Messung unmittelbar an der Stirnseite der Küvette war wegen der Größe der Thermosäule nicht möglich.

Für das Aktionsspektrum wurden Interferenz-Linien-Filter der Firma Schott & Gen/Mainz mit einer maximalen Transmission von 27 - 45 % und einer Halbwertsbreite von 9 - 15 nm verwendet.

Entsprechend dem Filtersatz wurde die photo-topotaktische Reaktion der *Euglena gracilis* bei jeweils quantengleicher Strahlung bei folgenden Intensitäten getestet:

1,68 n E/cm². sec
2,80 n E/cm². sec
3,92 n E/cm². sec.

Die Abstufung der Strahlungsenergie ergab sich aus Versuchen. Erst von 1,68 n E/cm². sec an waren die Reaktionen der *Euglena gracilis* zuverlässig auswertbar über den Bereich des sichtbaren Spektrums. Die Belastbarkeit der Filter und die Leistung der Xenonlampe bestimmten die höchste Energiestufe, die mit der Versuchsanlage getestet werden konnte. Auf Grund dieser Gegebenheiten wurde als mittlere Energiestufe 2,80 n E/cm². sec festgelegt.

Die Reaktionen der *Euglena gracilis* wurden bei Wellenlängen größer als 700 nm zusätzlich bei 0,56 und 1,12 n E/cm². sec getestet. Die Versuche ergaben trotz der niedrigeren Energien für diesen Spektralbereich noch gut auswertbare Ergebnisse im Gegensatz zu den anderen untersuchten Wellenlängen.

Mindestens zehn Versuche wurden für jede Wellenlänge und jede Energiestufe durchgeführt. Die gewonnenen Meßwerte wurden gemittelt und als Reaktionswerte in Abhängigkeit von den Wellenlängen in Abb. 5 dargestellt.

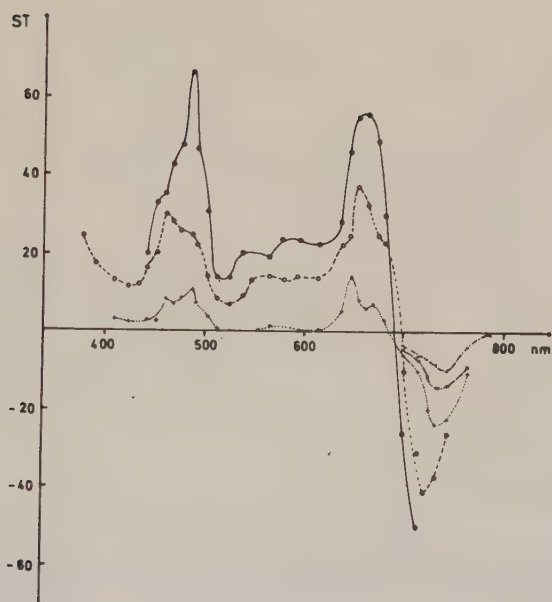


Abb. 5: Abhängigkeit der photo-topotaktischen Reaktionsgrößen von den Wellenlängen des Lichtes bei verschiedenen Strahlungsintensitäten.

- . - . - . - . = $0,56 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$;
- . . - . . - . . = $1,12 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$;
- = $1,68 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$;
- - - - - = $2,80 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$;
- _____ = $3,92 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$.

Die geringe Schwankungsbreite der Meßwerte innerhalb der Meßreihen (z. B. von maximal ± 5 Reaktionseinheiten bei $5,92 \text{ nE} / \text{cm}^2 \cdot \text{sec}$) beweist die Konstanz der photo-topotaktischen Reaktion, die durch die Anzucht der *Euglena gracilis* in der homokontinuierlichen Anlage erreicht wurde. Abweichungen der Reaktionsgrößen von denen vorangegangener Versuchsreihen gaben oft Hinweise auf Schwankungen der Intensität des Locklichtes, die z. B. durch plötzlich auftretende Luftblasen in der Wasserküvette entstehen konnten. Ein Vergleich der drei Kurven in Abb. 5 zeigt Verschiebungen der Extremwerte und Schultern in Abhängigkeit von der Energie.

Tabelle der Extremwerte und Schultern der Meßwertkurven
.....
zur photo-topotaktischen Reaktion der *Euglena gracilis*
.....

in Abb. 5

.....

a.) Die positive Reaktion:

(Der Index der Maxima gibt deren relative Höhe für die jeweilige Energiestufe an.)

Blaubereich			Rotbereich			
Energie (nm/cm ² ·sec)	Schulter	Maxima	Schulter	Schulter	Maxima	Schulter
1,68		461 nm ₃			646 nm ₁	
		487 nm ₂			669 nm ₄	
2,80		461 nm ₂	487 nm	640 nm-	654 nm ₁	665 nm-
				646 nm		680 nm
3,92			493 nm-			
			503 nm			
	450 nm-					
	461 nm					
		487 nm ₁			659 nm ₂	
	451 nm-					
	476 nm					

b.) Die Konter-Reaktion:

(Der Ausdruck "Konter-Reaktion" wurde gewählt, da zwischen der negativen Reaktion bei hohen Lichtintensitäten und dieser Reaktion kein unmittelbarer Zusammenhang besteht).

Rotbereich		
Energie (nE/cm ² . sec)	Schulter	Extremwert
0,56	715 nm (ausgeprägt)	743 nm
1,12	715 nm (weniger ausgeprägt)	734 nm
1,68	700 nm-(angedeutet) 715 nm	734 nm
2,80		724 nm
3,92		724 nm (interpoliert)

- - - - -

Mit den Werten der Kurven in Abb. 5 wurden Dosis-Effektkurven gezeichnet, die in den Abbildungen 6 a - 6 f zusammengestellt wurden. Für das Aktionsspektrum sensu strictu der Photo-topotaxis von *Euglena gracilis* wurde die Energie ermittelt, die nötig war, um einen Kurvenanstieg von 30 Skalenteilen innerhalb unseres Meßsystems zu erlangen.

Diese Bezugsgröße wurde gleich eins gesetzt (30 Skalenteile = 1). Der reziproke Wert dieser Größen ergab die relative Quantenwirksamkeit, die in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen das Aktionsspektrum der Abb. 7 ergab.

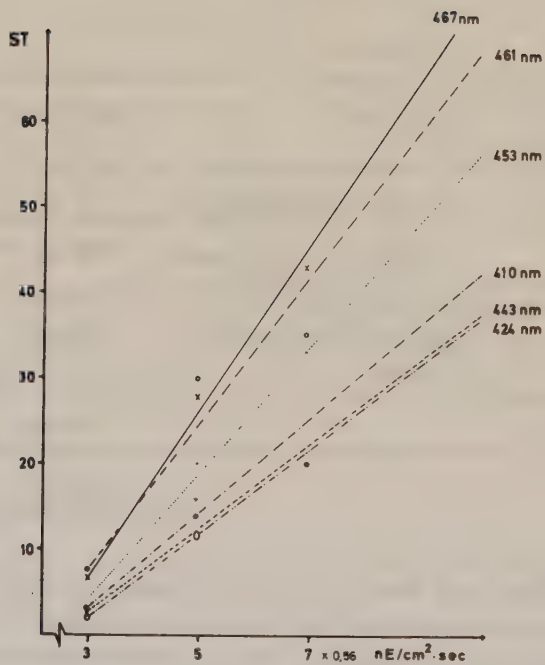


Abb. 6a: Dosis-Effektkurven für die Wellenlängen
410 - 467 nm

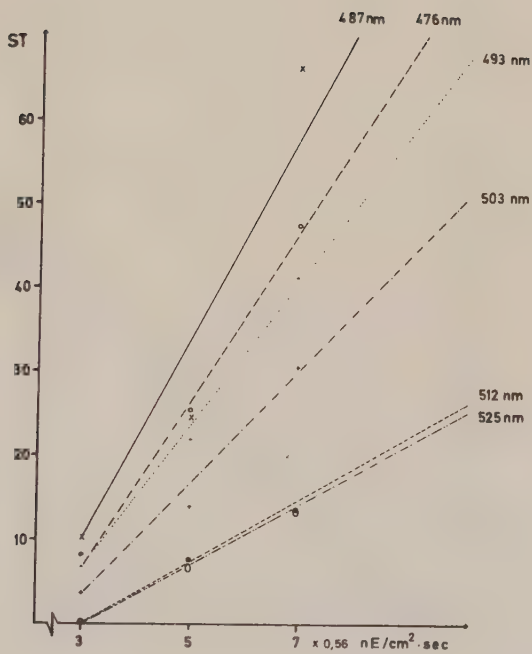


Abb. 6b: Dosis-Effektkurven für die Wellenlängen
476 - 525 nm

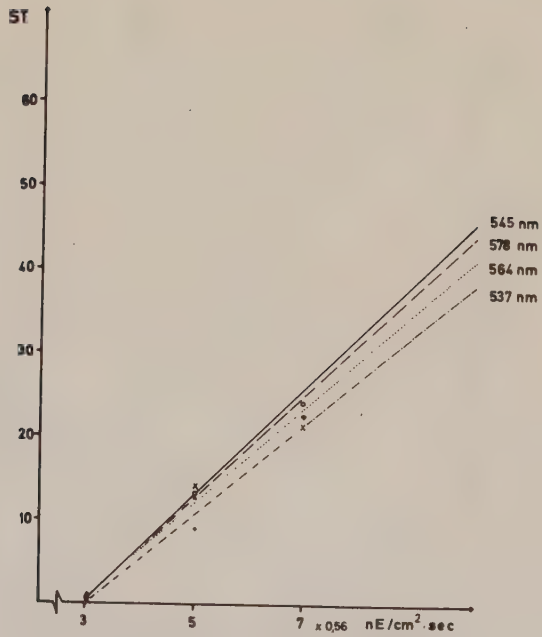


Abb. 6c: Dosis-Effektkurven für die Wellenlängen
537 - 578 nm

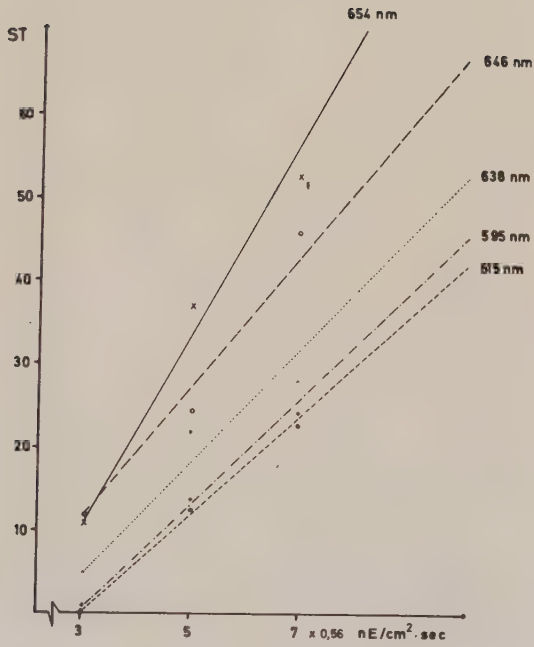


Abb. 6d: Dosis-Effektkurven für die Wellenlängen
595 - 654 nm

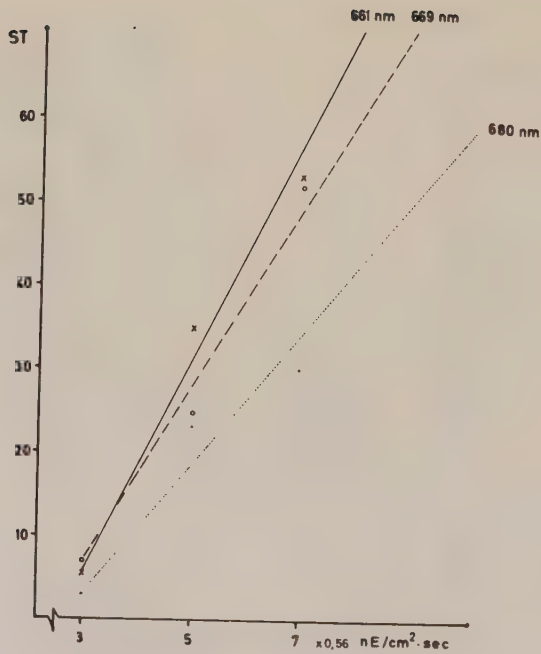


Abb. 6e: Dosis-Effektkurven für die Wellenlängen
661 - 680 nm

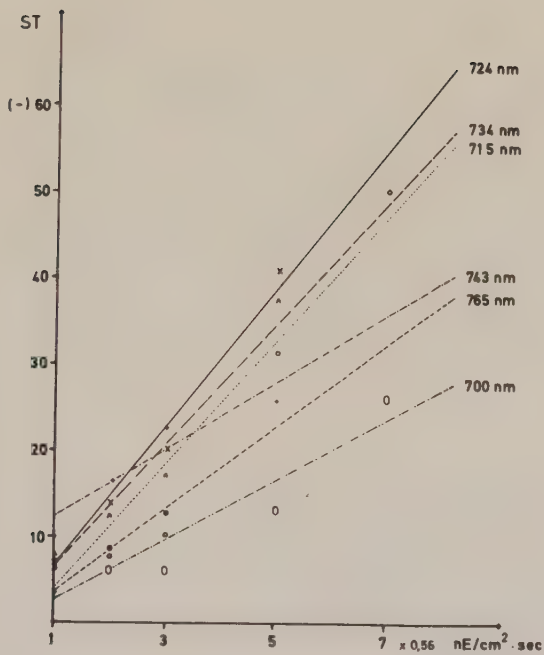


Abb. 6f: Dosis-Effektkurven für die Wellenlängen
700 - 765 nm

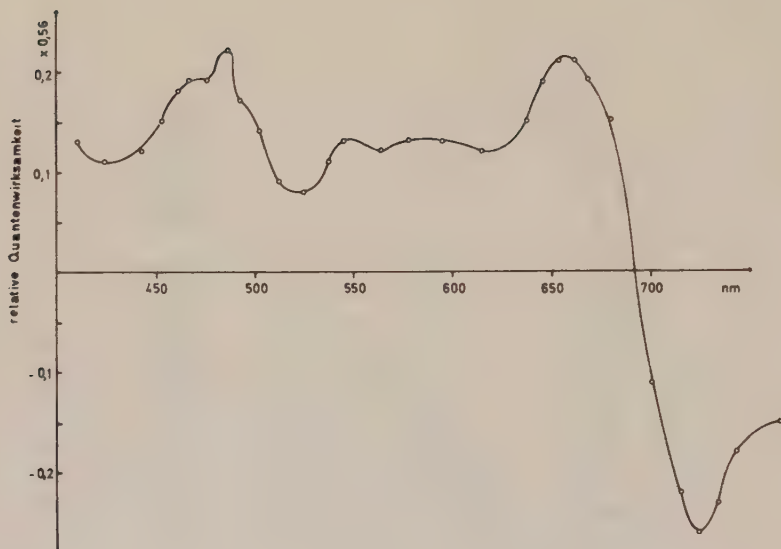


Abb. 7: Aktionsspektrum der photo-topotaktischen Reaktion.

Das Spektrum ergab für die positive Reaktion ein Maximum im Blaubereich bei 487 nm mit benachbarten Schultern von 461 nm - 476 nm und von 493 nm - 502 nm. Ein weiteres Maximum lag im Rotbereich zwischen 654 nm und 661 nm. Bei 724 nm war die Konter-Reaktion am stärksten.

Aus dem Aktionsspektrum geht hervor, daß der Spektralbereich oberhalb 680 nm die Konter-Reaktion auslöste. Dieser Befund machte eine Überprüfung der Meßlichtwirkung auf die Reaktion erforderlich. Der Spektralbereich des Meßlichtes (RGN 9 Filter) überlappte den wirksamen Rotlichtanteil. Beobachtungen ergaben, daß die Reaktion ab 700 nm stets entgegengesetzt zur Lichtrichtung ausfiel, gleichgültig, ob zu dem Locklicht das Meßlicht zugeschaltet wurde oder nicht. Die Aufzeichnungen des Schreibers stimmten mit diesen Feststellungen überein. Alle aufgezeichneten Kurven zeigten eine mehr oder weniger starke Konter-Reaktion an. Die Filter über den Photowiderständen konnten das Streulicht des Locklichtes nicht mehr absorbieren. Deshalb verstärkten sich die periodisch wiederkehrenden Zacken in den Schreiberkurven. Abb. 8 zeigt typische Kurvenläufe in diesem Spektralbereich.

Das Locklicht seinerseits konnte keine Konter-Reaktionen auf dem Schreiber vortäuschen. Das zeigte sich eindeutig bei den folgenden Hemmstoffversuchen. Bei diesen Versuchen traten in diesem Spektralbereich keine Reaktionen auf. Die Schreiberkurven zeigen die gleichen Zacken aber keine Steigung. (vgl. Abb. 8)

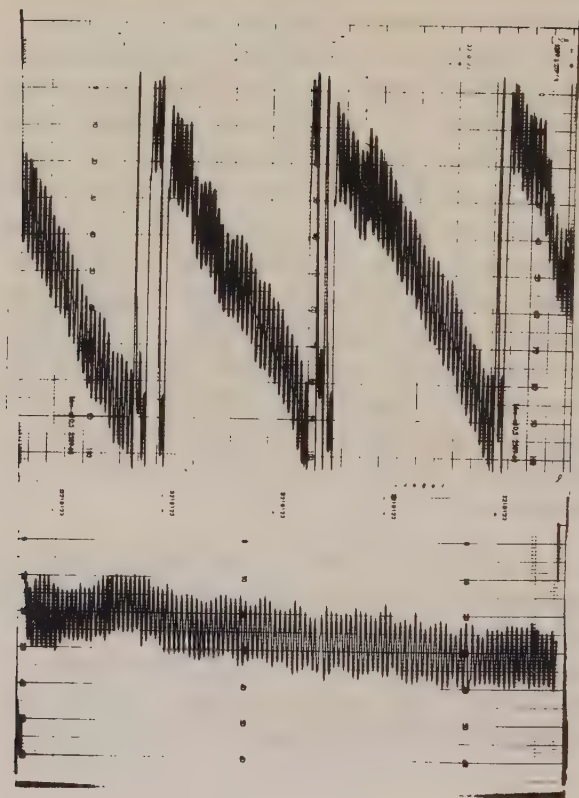


Abb. 3: Reaktionsaufzeichnungen der Photo-topotaxis von *Euglena gracilis* unter verschiedenen Anzuchtbedingungen bei 724 nm, 2,8 nE/cm². sec.
oben: autotroph, homokontinuierlich (Anzucht b.S. 19)
unten: mixotroph, stationär (Anzucht c. S. 21)

4.) VERSUCHE ZUR INTERPRETATION DES AKTIONSSPEKTRUMS

A.) Hemmstoffversuche mit DCMU

Das vorliegende Aktionsspektrum der Photo-topotaxis von *Euglena gracilis* weist auf Beziehungen zwischen Photo-topotaxis und Photosynthese hin.

Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen einiger älterer Autoren.

CHECCUCCI et al. (1974) ziehen zur Interpretation der nicht beobachteten Reaktion im Rotlicht eine mögliche Überlagerung der Phototaxis durch aerotaktische Reaktionen in Betracht. Aerotaktische Reaktionen sind bei Verwendung des Phototaxigraphen insofern möglich als sie ausgelöst werden können durch die Sauerstoffproduktion der Euglenen in der Lichtfalle. Aber auch in der von uns benutzten Apparatur sind derartige Überlagerungen grundsätzlich möglich (s. S. 10).

Um diese Möglichkeit näher zu prüfen, führten wir Hemmstoffversuche mit DCMU (3(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff) durch. Der Hemmstoff greift im Photosystem II zwischen Quencher und Plastochinon ein (DUYSENS, SWEERS, 1963). Die an das Photosystem II gekoppelte Sauerstoffproduktion wird dadurch unterdrückt. Für die Versuche wurden die Euglenen nach dem Anzuchtverfahren c. S. 21 gezogen.

a.) Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration

Die Messungen wurden bei $25 \pm 1^{\circ} \text{C}$ in einer Klimakammer durchgeführt. Die *Euglena*-Kulturproben wurden 2 Minuten vor Versuchsbeginn mit der jeweiligen DCMU-Menge versetzt.

Für die Geschwindigkeitsbestimmung wurde eine Zählkammer nach Thoma verwendet. Die Mikroskopbeleuchtung war so abgeblendet, daß die Zählkammer mit 50 Lux Weißlicht durchleuchtet wurde.

Es wurde die Zeit gestoppt, die verging, bis die jeweilige *Euglena* 1/10 mm zurückgelegt hatte. Für jede DCMU-Konzentration wurden mindestens 100 Messungen durchgeführt.

Die Geschwindigkeit V in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration ist in Abb. 9 dargestellt.

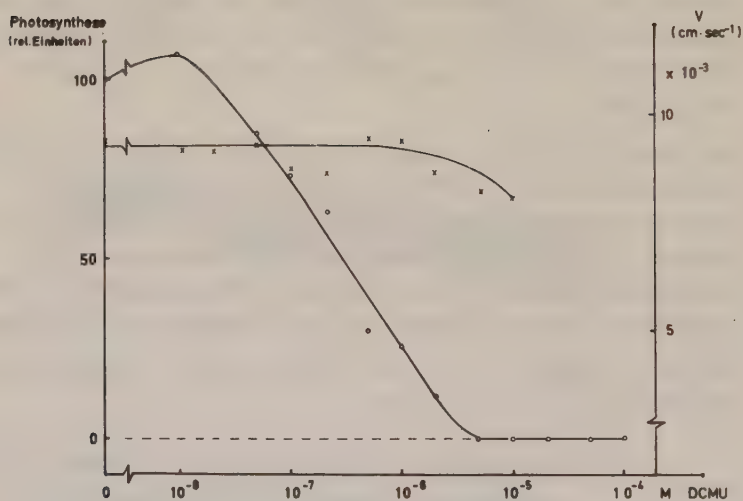


Abb. 9: Einfluß von DCMU auf die Bewegungsgeschwindigkeit (x-x-x-) und die Sauerstoffentwicklung der Photosynthese (o-o-o-) bei *Euglena gracilis*.

b.) Bestimmung der Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration

Zur Messung der DCMU-Wirkung auf die O_2 -Entwicklung wurden die Proben ebenfalls 2 Minuten vor Beginn der Messung mit der jeweiligen DCMU-Dosis versetzt. Die O_2 -Entwicklung wurde bei dieser Testreihe wiederum polarographisch mit dem Oxigraphen gemessen. Jedoch wurden die Euglenen zu diesem Zweck nicht mehr in den Warburgpuffer Nr. 9 überführt, sondern in ihrem Kulturmedium belassen.

So bestand die Gefahr, daß bei der Messung eventuell entstehende CO_2 -Defizite die Meßwerte beeinflussen konnten. Diese Fehlerquelle wurde nicht ausgeschaltet, da es bei der Versuchsreihe nicht um die Überprüfung der Konstanz der Photosyntheserate ging, sondern die O_2 -Produktion im Kulturmedium in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration in Bezug auf die photo-topotaktische Reaktion untersucht werden sollte.

Bei der Durchführung der Messungen machte sich ein CO_2 -Defizit erst zu einem Zeitpunkt bemerkbar, zu dem keine Messungen mehr durchgeführt wurden und der auch außerhalb der Versuchszeit zur Photo-topotaxis lag (ca. 10 Minuten).

Die Hemmung der O_2 -Entwicklung in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration ist ebenfalls in Abb. 9 eingetragen.

Aus dem Kurvenlauf geht hervor, daß bei niedrigen DCMU-Konzentrationen bei 10^{-8} Mol/Liter eine Stimulation der Sauerstoffentwicklung zu verzeichnen war. Erst ab 2×10^{-6} Mol/Liter hemmte DCMU die Sauerstoffproduktion vollständig.

c.) Photo-topotaktisches Verhalten unter DCMU-
Einwirkung bei verschiedenen Wellenlängen

Die DCMU-Wirkung auf die Photo-topotaxis von *Euglena gracilis* wurde bei 424 nm, 461 nm, 487 nm und 654 nm und einer Energie von $2,8 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$ untersucht.

Die Wellenlänge 424 nm liegt nahe der Soret-Bande (430 - 440 nm). Nach WOLKEN (1961) zeichnet sich dieser Spektralbereich bei *Euglena* durch die größte Photosynthesewirksamkeit aus. Nach dem Aktionsspektrum fällt in diesem Bereich die photo-topotaktische Reaktion sehr schwach aus. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der Hypothese von CHECCUCCI et al. (1974), die eine Aerotaxis als Erklärung für die starke Reaktion im Rotbereich heranziehen, denn im Falle einer Aerotaxis müßte die Reaktion auch in diesem Spektralbereich auftreten und nicht nur im Rotbereich. Deshalb wurde diese Wellenlänge zusätzlich zu den Reaktionsmaxima bei 461 nm und 654 nm für die Untersuchungen ausgewählt. Die Reaktionen auf DCMU im Bereich der Schulter bei 487 nm waren von Interesse. Bei $3,92 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$ liegt hier das Maximum des Blaubereiches, der bei dieser Energie eine stärkere Wirksamkeit besitzt als der Rotbereich. Untersuchungen bei 724 nm waren nicht möglich, da die *Euglenen* unter den veränderten Kulturbedingungen keine Reaktionen oberhalb 680 nm zeigten (vgl. S.68).

In der folgenden Tabelle sind die Reaktionsgrößen aus Abb. 5 den Meßdaten der Photo-topotaxis gegenübergestellt, die für obige Wellenlängen unter den veränderten Anzuchtbedingungen erhalten wurden.

Tabelle der Reaktionsgrößen der Photo-topotaxis von

 Euglena gracilis im Medium nach CRAMER und MYERS

 unter verschiedenen Anzuchtbedingungen +

Kulturverfahren

Wellenlänge	homokontinuierlich		stationär	
	Reaktionsgröße		Reaktionsgröße	
424 nm	12	ST	37	ST
461 nm	30	ST	62	ST
487 nm	24,8	ST	62	ST
654 nm	37	ST	20	ST
724 nm	40,8 (-)	ST	-	ST

+ (für 2,8 nE/cm². sec)

- - - - -

Für die Versuche wurden die Euglenakulturen 2 Minuten vor dem Reaktionstest mit DCMU versetzt. Das Versuchsmaterial wurde nach jedem Versuch verworfen. Die Versuchsreihen wurden 5 - 10 mal wiederholt.

Die Änderungen des photo-topotaktischen Verhaltens bei den verschiedenen Wellenlängen des Locklichtes in Abhängigkeit von der DCMU-Konzentration sind in den Abbildungen 10 - 13 dargestellt.

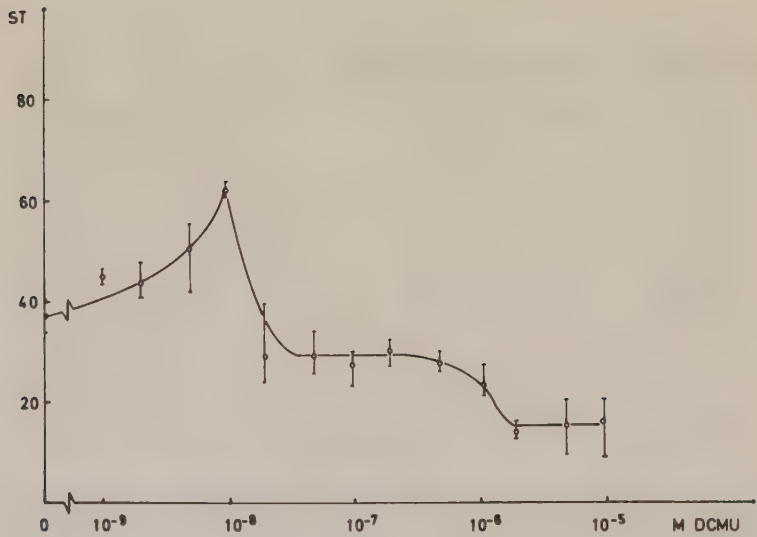


Abb. 10: Einfluß von DCMU auf die Photo-topotaxis
bei 424 nm.
Die Intensität betrug 2,8 nE/cm². sec.

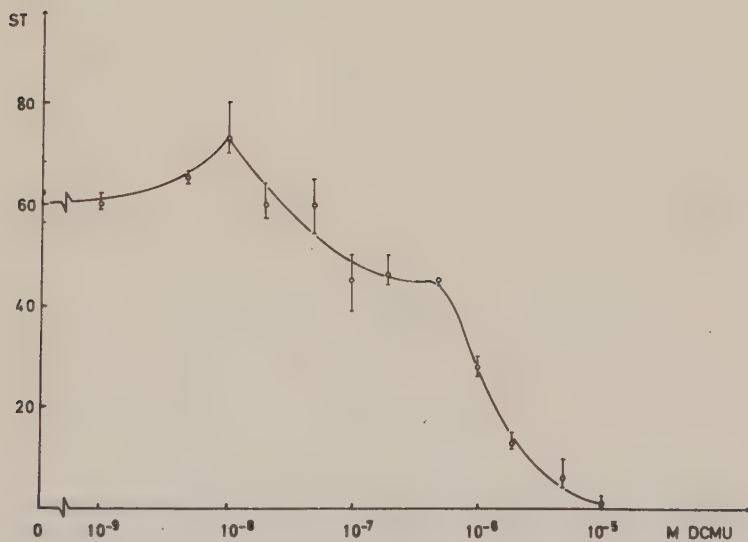


Abb. 11: Einfluß von DCMU auf die Photo-topotaxis
bei 461 nm.
Die Intensität betrug $2,8 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$.

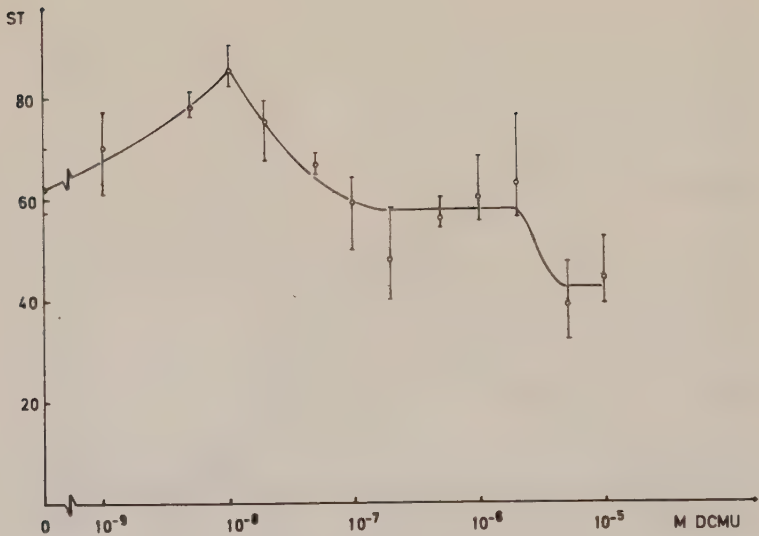


Abb. 12: Einfluß von DCMU auf die Photo-topotaxis
bei 481 nm.

Die Intensität betrug $2,8 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$.

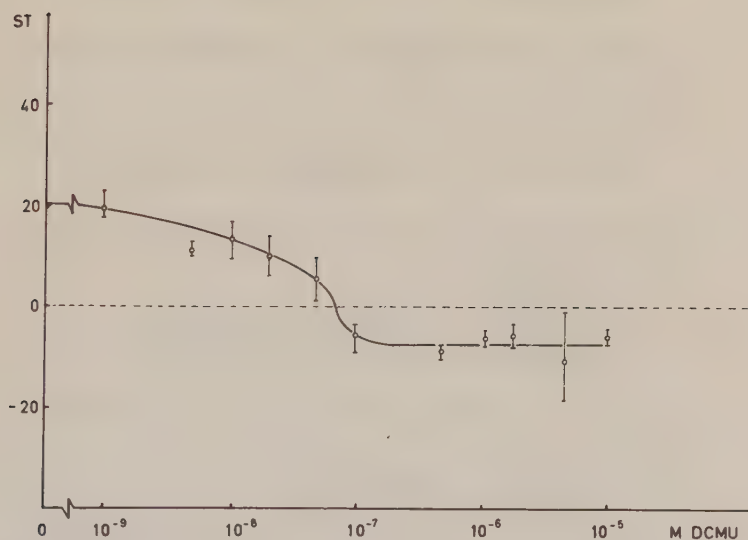


Abb. 13: Einfluß von DCMU auf die Photo-topotaxis
bei 654 nm.
Die Intensität betrug $2,8 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$.

Die Reaktionen im blauen Spektralbereich waren gekennzeichnet:

- 1.) durch einen unterschiedlichen Anstieg der photo-topotaktischen Reaktionsgröße bei niedrigen DCMU-Konzentrationen mit einem jeweiligen Maximum bei 10^{-8} Mol DCMU / Liter.
- 2.) durch einen sprunghaften, treppenartigen Verlauf der Dosis-Effektkurven.
- 3.) durch eine unterschiedlich starke Hemmung der Reaktion bei hohen DCMU-Konzentrationen.

Die Reaktion bei 654 nm unterschied sich von den Blaulichtreaktionen:

- a.) durch eine stetige Abnahme der Reaktion bei steigenden DCMU-Konzentrationen.
- b.) durch die Änderung des photo-topotaktischen Verhaltens.

Die anfänglich positive Reaktion verlief bei ca. 5×10^{-8} Mol DCMU / Liter entgegengesetzt. Sie blieb konstant im Bereich der höheren DCMU-Konzentrationen.

Die unterschiedliche, maximale Steigerung und Hemmung der Reaktionen durch DCMU bei den einzelnen Wellenlängen sind in Abb. 14 und 14a zusammengestellt. In Abb. 14 sind die gemessenen Reaktionsgrößen eingetragen, während in Abb. 14a die DCMU-Wirkungen zusammengefaßt sind als prozentuale Größen in Bezug auf die jeweilige Größe der Ausgangsreaktion.

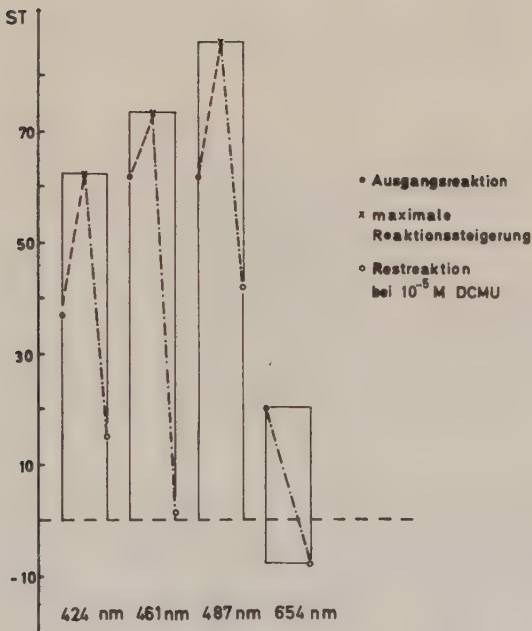


Abb. 14: Zusammenstellung der unterschiedlichen DCMU-Wirkung bei verschiedenen Wellenlängen (absolute Reaktionsgrößen).

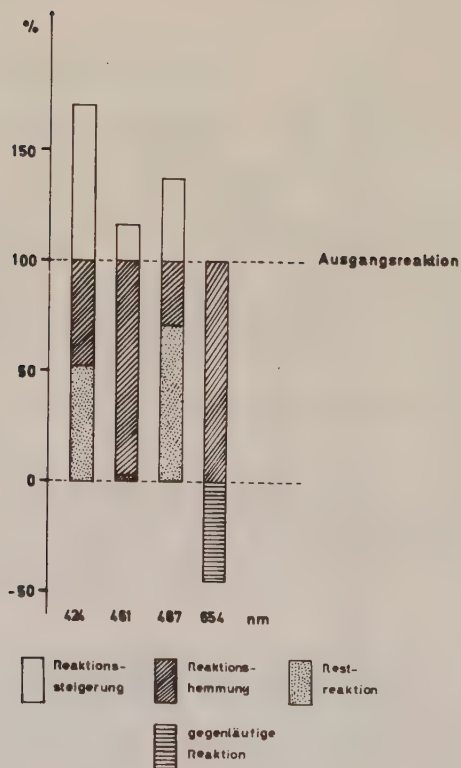


Abb. 14a: Zusammenstellung der unterschiedlichen DCMU-Wirkung bei verschiedenen Wellenlängen (prozentuale Größen in Bezug auf die Ausgangsreaktionen).

B.) Aktionsspektrum der negativen Photo-topotaxis von
Euglena gracilis.

BÜNNING und GÖSSEL untermauerten mit ihren Untersuchungen 1959 die Hypothese, daß das Aktionsspektrum der negativen Photo-topotaxis dem Absorptionsspektrum des Photorezeptorpigmentes entspräche, das Aktionspektrum der positiven Reaktion aber durch Addition des Photorezeptorpigmentes und des Abschirmpigmentes zustande käme.

So versprach die Aufstellung eines Aktionsspektrums der negativen Photo-topotaxis weitere Aufschlüsse für die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse.

Für die Versuche wurden Euglenakulturen eingesetzt, die nach dem Verfahren d. S.22 angezogen wurden.

Die Kulturmethode induzierte ein negatives photo-topotaktisches Verhalten im gesamten experimentell verfügbaren Energiebereich des Locklichtes, wie die Dosis-Effektkurven in Abb. 15 für die Wellenlängen 461 nm und 487 nm zeigen.

Das Aktionsspektrum der negativen Photo-topotaxis in Abb. 16 ergab sich aus den Reaktionen, die die jeweiligen Wellenlängen des Locklichtes bei $2,8 \text{ nE/cm}^2 \cdot \text{sec}$ auslösten.

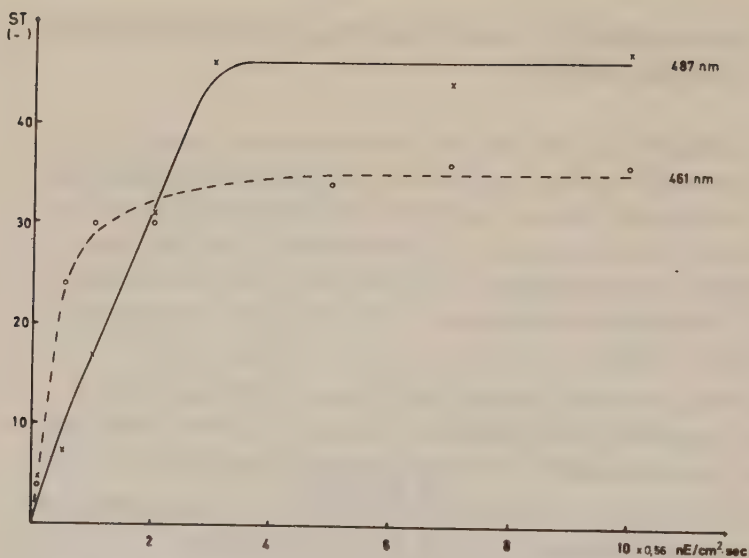


Abb. 15: Dosis-Effektkurven der negativen Photo-topotaxis.

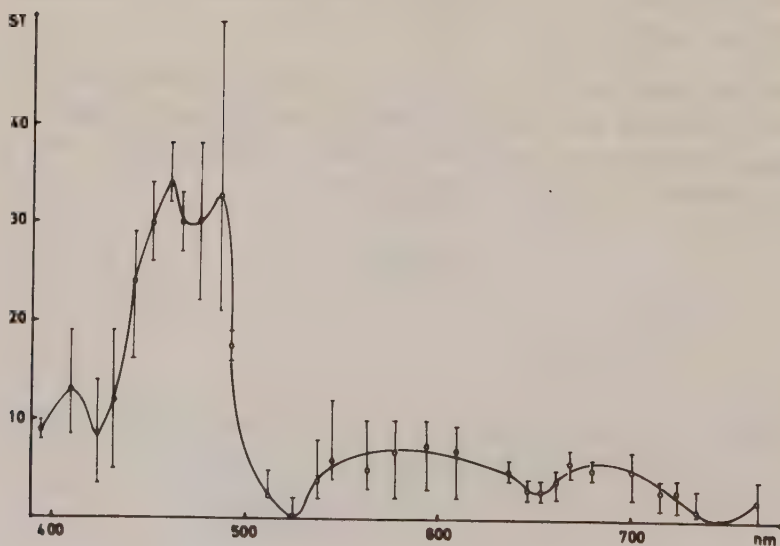


Abb. 16: Aktionsspektrum der negativen Photo-topotaxis.

Jede Wellenlänge wurde 10 mal getestet. Der Mittelwert der Messungen und der Streubereich wurden in die graphische Darstellung eingetragen.

Das Aktionsspektrum ähnelt dem von BÜNNING und GÖSSEL (1959) aufgestellten Wirkungsspektrum für hell adaptierte Euglenen und dem Spektrum von DIEHN (1969b), für das polarisiertes Licht verwendet wurde, dessen Schwingungsebene in der Längsrichtung der Euglenen verlief.

Das Spektrum enthält keine Hinweise auf Einflüsse der Photosynthese. Die große Streuung der Meßwerte bei 487 nm hat ihre Ursache darin, daß das absolute Maximum der topischen Reaktion in einer Versuchsreihe bei 487 nm lag, während bei anderen Serien dieses Maximum zu einer Schulter wurde, wie in dem Spektrum von BÜNNING und GÖSSEL. Die Werte oberhalb 520 nm sind nicht signifikant, da die Streuung der Werte zu groß ist.

C.) Versuche zur Aerotaxis.

CHECCUCCI et al. (1974) diskutierten die Reaktion der Euglenen im Rotbereich in Zusammenhang mit einer eventuellen aerotaktischen Reaktion, die innerhalb der Versuchsanordnung eine photo-topotaktische Orientierung der Euglenen vortäuschen könnte.

Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden

a.) Kapillarversuche mit dem Mikroskop
und

b.) Tests in einer Chemotaxisküvette

durchgeführt.

Die Versuchskulturen wurden 14 Tage in dem modifizierten Medium nach CRAMER und MYERS (1952) (vgl. S. 19) angezogen unter Beibehaltung der übrigen Anzuchtbedingungen für stationäre Kulturen.

a.) Kapillarversuche

Ein Tropfen Euglenakultur wurde auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt, das mit Deckglassplittern unterstützt wurde. Um einen Gasaustausch der Kultur mit der Raumluft zu verhindern, wurde das Deckglas mit Paraffin/Vaseline umrandet. Durch diese Umrandung wurde in verschiedenen Zeitabständen (bis maximal 10 Minuten) eine Glaskapillare geschoben. Die Kapillaren enthielten als Testgase Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxid und Raumluft. Eine erhöhte oder verringerte Anzahl der Euglenen im Bereich der Kapillarspitzen sollte Hinweise auf chemotaktische Reaktionen der *Euglena gracilis* liefern.

Bei allen Gasen trat eine Ansammlung der Euglenen im Bereich der kleinen Gasblase auf, die an der Kapillarspitze austrat.

Eine unterschiedliche Ansammlungsstärke konnte bei den mikroskopischen Beobachtungen nicht eindeutig festgestellt werden. Jedoch konnte beobachtet werden, daß durch die unterschiedlichen Spannungsverhältnisse innerhalb des Kulturmediums im Bereich der Gasblasen - besonders im Grenzflächenbereich der Flüssigkeit - die Euglenen in ihren Bewegungsbahnen beeinflußt wurden. Die Ansammlungen müssen primär auf physikalische Kräfte zurückgeführt werden. Deshalb gaben diese Versuche keinen Aufschluß über eine aerotaktische Reaktion.

b.) Versuche in einer Chemotaxisküvette

Die für diese Versuche benutzte Küvette ist in Abb. 17 abgebildet.

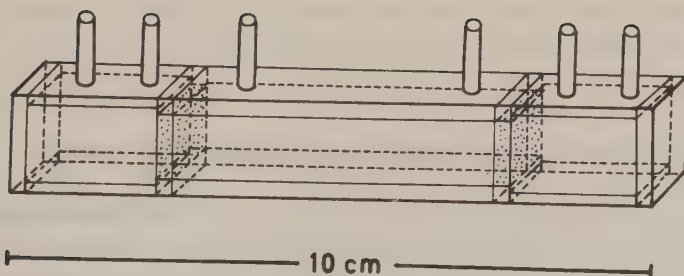


Abb. 17: Chemotaxisküvette (Seitenwände sind nicht eingezeichnet).

In die mittlere Kammer wurde die Euglenakultur eingefüllt, während die Testgase durch die Seitenkammern strömten.

Die Gase mußten unter leichtem Überdruck stehen, da sonst das Kulturmedium durch die Frittenwände in die Seitenkammern durchtrat.

Bei allen Gasen ergaben die Beobachtungen, daß sich die Euglenen an den Frittenwänden ansammelten. Die Ansammlung konnte jedoch nicht auf chemotaktische Reaktionen zurückgeführt werden. Die Euglenen haften fest an den rauen Frittenwänden. Ferner bildeten sich die bereits erwähnten Muster aus, die in keinem ursächlichen Zusammenhang mit aerotaktischen- bzw. chemotaktischen Phänomen stehen (NULTSCH und HOFF, 1973).

Auch diese Methode war somit zum Nachweis einer chemotaktischen Reaktion ungeeignet.

D.) Versuche in der Apparatur nach NULTSCH et al.

Die vorliegenden Meßergebnisse der Versuchsreihen zur Photo-topotaxis von *Euglena gracilis* können eventuell durch den Intensitätsgradienten des Locklichtes und des damit verbundenen Photosynthesegradienten beeinflusst werden. Deshalb mußte überprüft werden, ob die photo-topotaktisch wirksamen Spektralbereiche - vor allem der Rotbereich - die Wirksamkeit behalten, wenn kein Gradient vorliegt.

NULTSCH et al. (1971) verhinderten die Gradientenbildung, indem die Meßküvette in einem Winkel von 45° zum Locklicht montiert wurde (vgl. S. 8ff).

Für die Versuche wurde das Umpumpsystem der homokontinuierlichen Kultur unserer Apparatur mit der Meßanordnung von NULTSCH et al. unter Beibehaltung der Anzuchtbedingungen gekoppelt.

Die Versuchsergebnisse mit dieser Apparatur wurden qualitativ ausgewertet. Die Schreiberkurven ließen nur eine qualitative Aussage über den Verlauf der Reaktionen zu.

Die Musterbildungen und die Sedimentationserscheinungen verhinderten eine Standardisierung der Versuchsdurchführung für alle Meßreihen.

Die in der nachstehenden Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnisse entstammen zwei verschiedenen Versuchsreihen. Aus der Tabelle ergibt sich, daß bei dieser Meßanordnung die Reaktionen qualitativ ähnlich denen verliefen, die in der rotierenden Küvette unserer Meßanordnung auftraten.

Zusammenstellung der Versuchsergebnisse mit der Meß-
anordnung nach NULTSCH et al.

für die Photo-topotaxis nach *Euglena gracilis*.

Qualität des Locklichtes	Größe der Strahlungs- intensität	Größe der Reaktion ST	Serie
Weißlicht	10 000 Lux	30,5	I
Weißlicht	20 000 Lux	54	I
RG 640 nm	1 000 erg/cm ² . sec	55	I
RG 640 nm	1 000 erg/cm ² . sec	66	II
BG 28	2 400 erg/cm ² . sec	200	II
IL-Filter			
661 nm	1 250 erg/cm ² . sec	200	II
734 nm	1 200 erg/cm ² . sec	- 17,5	II
476 nm	1 300 erg/cm ² . sec	56	II
Dunkelkontrolle			II

(ST = Anstieg der Schreiberkurve um die entsprechende
Anzahl an Skalenteilen innerhalb von zwei Minu-
ten)

5.) DISKUSSION

Die experimentellen Daten zur Photo-topotaxis von *Euglena gracilis* werfen verschiedene, miteinander verknüpfte Probleme auf.

- 1.) Das Aktionsspektrum zeigt, daß neben der blauen Strahlung auch der bislang als unwirksam angesehene rote Spektralbereich zu einer Dichteasymetrie in der Versuchsküvette führt.
- 2.) Oberhalb von 700nm tritt eine Konter-Reaktion auf, die mit der negativen Photo-topotaxis von *Euglena* nach den vorliegenden Befunden nicht identisch ist.
- 3.) Das Aktionsspektrum und die DCMU-Versuche weisen einen Einfluß der Photosynthese auf die Orientierung der *Euglena* nach.
- 4.) Die Blaulichtreaktion kann nicht isoliert von der Rotlichtreaktion betrachtet werden, weil die Photosynthese vornehmlich durch blaue und rote Strahlung aktiviert wird. Daraus ergeben sich zusätzliche Schwierigkeiten für die Deutung der Reaktionen im Blaubeereich.
- 5.) Unterschiedliche Hemmwirkung des DCMU und die Aktionspektren der Photo-topotaxis (vgl. Abb. 10 - 14a und Abb. 7 + 16) lassen den Schluß auf zwei getrennte Orientierungsmechanismen zu.

ad 1: Die Rotlichtreaktion.

CHECCUCCI et al. (1974) zeigten, daß Rotlicht zu Ansammlungen von *Euglena* in einer Lichtfalle führt. Die Untersuchungen von WOLKEN und SHIN (1958) und SCHMIDT et al. (1972) enthalten ebenfalls Hinweise auf Einflüsse des Rotlichtes auf die Bewegungssteuerung von *Euglena gracilis*.

WENDEROTH (1975) fand bei Diatomeen Reaktionen im Rotbereich, die er als phobische Reaktionen identifizierte. Die Vermutung von NULTSCH (1973, 1974), daß ein Zusammenhang zwischen Photosynthese und der Phototaxis nur bei Prokaryonten bestehe, scheint sich nicht zu bestätigen.

Die Reaktionen im Rotlicht bei *Euglena* können in der Lichtfalle (CHECCUCCI et al., 1974) sowohl durch die Lichtfalle als auch durch das von der Falle ausgehende Streulicht verursacht werden. CHECCUCCI et al. ziehen die Aerotaxis als mögliche Erklärung für die Ansammlung heran. Die Literatur und obige Arbeit enthalten jedoch keine eindeutigen Hinweise auf eine chemotaktische Reaktion der *Euglena* auf Sauerstoff. Die Kapillarversuche und die Untersuchungen mit der Chemotaxisküvette konnten ebenfalls keinen Beweis auf eine derartige Reaktion erbringen.

Daß die Rotlichtreaktionen in der Drehküvette auf einer - durch die Rotation erschwerten - O_2 -Gradientenbildung im Kulturmedium beruht, erscheint fraglich. Die Versuche in der Meßanordnung nach NULTSCH et al. (1971) lieferten bei weitestgehender Ausschaltung von Gradienten qualitativ ähnliche Versuchsergebnisse. (vgl. Tabelle S. 64)

Dem stehen die Ergebnisse der DCMU-Versuche gegenüber, wonach DCMU die Orientierung teilweise oder ganz hemmt. Die Steigerung der O_2 -Produktion bei DCMU-Konzentrationen unter 10^{-8} Mol/Liter läuft Hand in Hand mit einer verstärkten Ansammlung der *Euglena* in dem, dem blauen Locklicht zugewandten Küvettenabschnitt. Diese Befunde scheinen die Aerotaxis-Hypothese zu stützen.

ad 2: Die Konter-Reaktion.

Die Reaktion wurde als Konter-Reaktion bezeichnet, da auf Grund des Aktionsspektrums der negativen Phototaxis (Abb. 16) kein Zusammenhang zwischen beiden Reaktionen zu bestehen scheint. Die Wellenlängen um 724 nm lösten die stärksten Reaktionen aus. Ähnliche oder gleiche Zusammenhänge, wie sie HÄDER (1974) für die Reaktionen von *Phormidium uncinatum* fordert, könnten auch hier möglich sein.

Daß eine derartige Reaktion bislang für *Euglena* in der Literatur nicht erwähnt wurde, liegt wahrscheinlich an den besonderen Anzuchtbedingungen der homokontinuierlichen Kulturanlage mit ihrem Umpumsystem und der Glühlampenbeleuchtung des Vorflutgefäßes. Denn auffallend ist, daß bei den verschieden anderen Kulturverfahren, die wir für die Versuche einsetzten, keine signifikanten Konter-Reaktionen zu erzielen waren.

ad 3: Einfluß der Photosynthese auf die Reaktion.

Das Aktionsspektrum und die DCMU-Wirkungen zeigen, daß die Photosynthese zumindest für die Wirksamkeit des Rotbereiches verantwortlich ist.

Die Hemmwirkung des DCMU weist auf eine bedeutende Rolle des Photosystems II hin. Dieses System kann evtl. die Ansammlung der *Euglenen* im Rotbereich unterhalb 700 nm herbeiführen. Denn durch DCMU-Zugabe wurde die positive Reaktion bei 654 nm vollkommen unterdrückt. Auffallend ist, daß bei der Konzentration, bei der DCMU die O_2 - Entwicklung vollständig hemmt, die Reaktion in eine schwache Konter-Reaktion umschlug.

Hierfür könnte, ähnlich den Vorstellungen HÄDERS (1974), das Photosystem I verantwortlich sein.

Das Photosystem I könnte die ausgeprägten Konter-Reaktionen bei 724 nm auslösen, denn oberhalb 700 nm wird vornehmlich das Photosystem I angeregt. Somit würden Photosystem I und II antagonistische Wirkungen in Bezug auf die Ausrichtung der Euglena zum Locklicht bedingen. Aus dieser Annahme würde folgen, daß das Aktionsspektrum - zunächst für den Rotbereich - die Summation der Effekte des Photosystems I und Photosystems II beinhaltet. Auf dieser Basis ließen sich die Verschiebungen der Extremwerte und Schultern im Rotbereich innerhalb der verschiedenen Energiestufen in Abb. 5 als Additionswirkung der gegenläufigen Wirkungen der Photosysteme verstehen.

Das Ergebnis der Arbeit von BROWN und FRENCH (1961), daß langwelliges Rotlicht die Synthese von "long wavelength chlorophylls" bei Euglena induziert, erklärt vielleicht, weshalb die Kulturen, die ohne Glühlampenlicht nur mit Leuchtstoffröhren angezogen wurden, oberhalb 700 nm keine Konter-Reaktionen mehr zeigten. Ohne den langwelligen Rotanteil des Glühlampenlichtes fehlten die "long wavelength chlorophylls", die genügend Quanten für das Photosystem I absorbierten.

Die geringe Eigenabsorption der Euglenen oberhalb 700 nm ist evtl. die Ursache für den starken Ausfall der Konterreaktionen selbst bei niedrigeren Intensitäten im Vergleich zu dem übrigen untersuchten Spektralbereich.

ad 4: Die Reaktionen im Blaubereich.

Der Einfluß der Photosynthese auf die Orientierung der Euglena gracilis muß sich auch im Blaubereich des Spektrums bemerkbar machen. Die DCMU-Versuche bei 424 nm, 461 nm und 487 nm in Verbindung mit den Kurven der Abb. 5 liefern Ansätze für eine Deutung der Photosynthesewirkung auf die Orientierung der Euglena.

Die homokontinuierliche Kultur und die stationäre Kultur für die DCMU-Versuche ergaben unterschiedliche photo-topotaktische Reaktionsgrößen, die auf Seite 49 zusammengestellt sind. Die Reaktion ist bei 424 nm in der Nähe der Soret-Bande bei den homokontinuierlich gezogenen Euglenen sehr schwach. Die Depression könnte nicht eintreten, wenn die Euglenen aerotaktisch reagieren würden. Das Aktionsspektrum der Photosynthese weist für diesen Bereich die größte Sauerstoffentwicklung nach. Wenn jedoch Photosystem I und II antagonistische Einflüsse auf die Orientierung haben, so kann für 424 nm angenommen werden, daß die verstärkte Anregung des Photosystems I in diesem Spektralbereich die Wirkung des Photosystems II reduziert und daraus die schwache Reaktion resultiert. Der steile Kurvenanstieg bis 461 nm beruhte auf einer Absorptionssteigerung von Quanten durch Pigmente des Photosystems II.

Die größte prozentuale Steigerung der Reaktionsgröße bei 424 nm unter dem Einfluß niedriger DCMU-Konzentrationen bis 10^{-8} Mol/Liter spricht für die Vorstellung, daß das Photosystem II - Steigerung der O_2 - Produktion - eine größere Wirksamkeit gegenüber dem gegenläufigen Photosystem I gewinnt. Die Vorstellung läßt sich auch auf die Ergebnisse bei 461 nm und 487 nm übertragen.

Die DCMU-Hemmwirkung ist im Blaubereich bei den getesteten Wellenlängen 424 nm und 487 nm unvollständig und führt nur zu einer fast vollständigen Hemmung der positiven Reaktion bei 461 nm aber zu keiner Konter-Reaktion wie bei 654 nm.

ad 5: Vorstellungen zum Orientierungsmechanismus.

Die vergleichsweise geringe Hemmung durch DCMU bei 487 nm von nicht ganz $1/3$ der Ausgangsreaktion und das Aktionsspektrum der negativen Photo-topotaxis (Abb. 16) zeigen, daß sich die Ergebnisse des Blaubereiches nicht vollständig auf der Basis antagonistisch wirkender Photosysteme deuten lassen wie die Rotlichtreaktionen.

Neben der Photosynthese besteht ein weiterer Pigment-Reaktionskomplex, der die Bewegung von *Euglena gracilis* zum Licht ausrichtet. Für diesen Komplex dürften die bisherigen, grundlegenden Vorstellungen zu Stigma und Paraflagellarkörper für die Orientierung von *Euglena gracilis* zutreffen. Der Schluß wird gestützt durch das Aktionsspektrum der negativen Photo-topotaxis und die nur graduelle Hemmung der Blaulichtreaktionen durch DCMU.

Die photo-topotaktische Reaktion wird überlagert oder beeinflußt durch die Photosynthese. Auf Grund der experimentellen Daten kann nicht geklärt werden, ob

- a.) die Photosynthese die Steuerung des Geißelschlages direkt beeinflußt - evtl. über Potentialänderungen ähnlich den Darlegungen von BOVELL und JAHN (1972) oder ob
- b.) durch Faktoren, die vom Geißelapparat unabhängig sind, wie z. B. durch pH-Änderungen während der Photosynthese, es zur Ausrichtung der *Euglena* kommt auf Grund hydrodynamischer Kräfteverhältnisse ähnlich den Vorstellungen von BOWNE und BOWNE (1967).

Von beiden Möglichkeiten erscheint die erstere die wahrscheinlichere zu sein. Potentialausbildungen sind gebunden an Gradientenbildungen der Ladungsträger. Derartige Gradienten werden bei der Photosynthese gebildet. Sie könnten sich bei genügender Größe auf die Steuerung des Geißelschlages der *Euglena gracilis* auswirken. Dabei könnten zeitliche Faktoren der Bewegungssteuerung (vgl. periodische Beschattung des Paraflagellarkörpers durch das Stigma) bestimmend werden, in welchem Maße Potentiale der Photosynthese wirksam werden können oder nicht. Dabei darf nicht vergessen werden, daß der pH-Wert und das Ionen-Milieu des Mediums ihrerseits die Potentialbildungen beeinflussen.

6.) ZUSAMMENFASSUNG

Eine Meßapparatur für photo-topotaktische Untersuchungen ganzer Organismenpopulationen wird beschrieben. Die Apparatur arbeitet nach dem Meßprinzip von FEINLEIB und CURRY (1967). Die rotierende Meßküvette ist durch ein neu entwickeltes Durchflußsystem mit einer homokontinuierlichen Kulturanlage gekoppelt. Das Durchflußsystem wurde den speziellen Bedürfnissen der *Euglena gracilis* angepaßt. Die photo-topotaktische Reaktion der homokontinuierlich gezogenen Euglenen ist unter gleichen Versuchsbedingungen konstant.

Die Kopplung der Kulturanlage mit der Meßküvette ermöglicht eine bislang für Versuche mit *Euglena gracilis* unerreichte Standardisierung der Versuchsdurchführung.

Die Nachteile der Meßapparatur - Gradientenbildung des Locklichtes und Vororientierung der Organismen durch die Drehung der Küvette - ergeben keine prinzipiellen Verfälschungen der Versuchsergebnisse. Das zeigte die qualitative Überprüfung der Ergebnisse in einer Versuchsanordnung nach NULTSCH et al. (1971), die diese Fehlerquellen nicht besitzt.

Die Versuchsergebnisse mit polarisiertem Licht unterstützen die Forderung, daß zwischen topischer und phobischer Reaktion streng zu unterscheiden ist. Die topische Reaktion von *Euglena gracilis* wird durch polarisiertes Licht nicht beeinflußt.

Das Aktionsspektrum der Photo-topotaxis von *Euglena gracilis* und die Hemmstoffversuche mit DCMU weisen einen Einfluß der Photosynthese auf die Orientierung der *Euglena* nach.

Nur einige Versuchsergebnisse lassen eine Aerotaxis - ausgelöst durch die Sauerstoffentwicklung während der Photosynthese - als mögliche Erklärung für die Rotlichtreaktionen der *Euglena gracilis* zu. Versuche zur Chemotaxis geben keine eindeutigen Hinweise für Reaktionen auf Sauerstoff.

Die Reaktionen im Rotlicht fallen unterschiedlich aus. Unterhalb von 700 nm sammeln sich die *Euglenen* in dem dem Locklicht zugewandten Küvettenabschnitt an, während sie sich oberhalb von 700 nm unter bestimmten Anzuchtbedingungen auf der entgegengesetzten Küvettenseite ansammeln. Letztere Reaktion wird als Konter-Reaktion bezeichnet zur Unterscheidung von der negativen Photo-topotaxis der *Euglena gracilis*.

Die experimentellen Ergebnisse lassen vermuten, daß

- a.) der erste Reaktionstyp unterhalb 700 nm durch das Photosystem II ausgelöst wird,
- b.) die Konter-Reaktion vor allem durch das Photosystem I beeinflusst wird.

Beide Photosysteme sind auch im Blaubereich wirksam.

Die unterschiedliche Hemmwirkung des DCMU und vor allem das Aktionsspektrum der negativen Photo-topotaxis zeigen jedoch, daß in diesem Spektralbereich ein weiterer Orientierungsmechanismus wirksam wird, der in keinem direkten Zusammenhang mit der Photosynthese steht. Dieser Mechanismus entspricht wahrscheinlich den bisherigen Vorstellungen zur Phototaxis von *Euglena gracilis*.

7.) LITERATURVERZEICHNIS

- BATRA, P.P. & TOLLIN, G.
(1964) Isolation of the Eye-Spot Granules
and Identifikation of the Eye-Spot
Pigments
Biochim.Biophys.Acta 79, 371-378.
- BERGMANN, K., BURKE, P.V., Phycomyces
CERDA-OLMEDO, E., Bacteriol. Rev. 33, 99-157.
DAVID, C.N.,
DELBRÜCK, M.,
FORSTER, K.W.,
GOODELL, E.W.,
HEISENBERG, M.,
MEISSNER, G.,
ZALOKAR, M.,
DENNISON, D.S. &
SHROPSHIRE, W.
(1969)
- BOUND, K.E. &
TOLLIN, G.
(1967) Phototactic Response of Euglena
gracilis to Polarized Light
Nature 216, 1042-1044.
- BOVEE, E.C. &
JAHN, T.L.
(1972) A Theory of Piezeoelectric Activity
and Ion-movements in Relation of
Flagellar Structures and their
Movements to the Phototaxis of
Euglena
J. theor. Biol. 35, 259-276.
- BOWNE, S.W. Jr. &
BOWNE, G.D.
(1967) Taxis in Euglena
Exper. Cell Res. 47, 545-553.

- BRINKMANN, K.
(1966) Circadiane Rhythmik von *Euglena*
Planta 70, 344-389.
- BRINKMANN, K.
(1968) Keine Geotaxis bei *Euglena*
Z. Pfl. Physiol. 59, 12-16.
- BROWN, J.S. &
FRENCH, C.S.
(1961) The Long Wavelength Forms of
Chlorophyll a
Biophys. J. 1, 539-550.
- BUDER, J.
(1917) Zur Kenntnis der phototaktischen
Richtungsbewegungen
Jb. wiss. Bot. 58, 105-220.
- BÜNNING, E. &
SCHNEIDERHÖHN, G.
(1956) Über das Aktionsspektrum der
phototaktischen Reaktionen von
Euglena
Arch. Mikrobiol. 24, 80-90.
- BÜNNING, E. &
TAZAWA, N.
(1957) Über die negativ-phototaktische
Reaktion von *Euglena*
Arch. Mikrobiol. 27, 306-310.
- BÜNNING, E. &
GÖSSEL, I.
(1959) Ergänzende Versuche über die photo-
taktischen Aktionsspektren von
Euglena
Arch. Mikrobiol. 32, 319-321.
- CHECCUCCI, A.
(1973) Photomotion Methodology
In "Primary molecular events in
photobiology"
(A. CHECCUCCI and R.A. WEALE, eds.)
217-244,
Elsevier Scientific Publishing
Company, Amsterdam, London,
New York.
- CHECCUCCI, A.,
COLOMBETTI, G.,
CARRATORE del, G.,
FERRARA, R. &
LENCI, F.
(1974) Red Light-Induced Accumulation
of *Euglena gracilis*
Photochem. Photobiol. 19, 223-226.

- CLAYTON, R.K.
(1957) Patterns of Accumulation Resulting from Taxes and Changes in Motility of Microorganisms
Arch. Mikrobiol. 27, 311-319.
- CLAYTON, R.K.
(1964) Phototaxis in Microorganisms
In "Photophysiology"
(A.C. GIESE, ed.) Vol. II, 51-77,
Academic Press, New York, London.
- CRAMER, M. &
MYERS, J.
(1952) Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*
Arch. Mikrobiol. 17, 384-402.
- DAVENPORT, D.
(1973) Studies in Microorganismal Behavior by Computerized Television.
In "Behaviour of Microorganisms"
(A. PEREZ-MIRAVATE, ed.) 106-116,
Plenum Press, London, New York.
- DIEHN, B.
(1969a) Action Spectra of the Phototactic Responses in *Euglena*
Biochim. Biophys. Acta 177, 136-143.
- DIEHN, B.
(1969b) Two Perpendicularly Oriented Pigment Systems involved in Phototaxis of *Euglena*
Nature 221, 366-367.
- DIEHN, B.
(1973) Phototaxis in *Euglena* 1:
Physiological Basis of Photoreception and Tactic Orientation.
In "Behaviour of Micro-Organisms"
(A. PEREZ-MIRAVATE, ed.) 83-90,
Plenum Press, London, New York.

- DIEHN, B. &
KINT, B.
(1970)
- DUYSENS, L.N.M. &
SWEERS, H.E.
(1963)
- ENGELMANN, TH. W.
(1882)
- FEINLEIB, M.E.H. &
CURRY, G.M.
(1967)
- FEINLEIB, M.E.H. &
CURRY, G.M.
(1971)
- FRÜHLICH, O. &
DIEHN, B.
(1974)
- Flavin Nature of Photoreceptor
Molekule for Phototaxis in Euglena
Physiol. Chem. Phys. 2, 483-488.
- Mechanism of two Photochemical
Reactions in Algae as studied
by Means of Fluorescence.
In "Studies on Microalgae and
Photosynthetic Bacteria"
Special issue of Plant and Cell
Physiol., Japan, Soc. of Plant
Physiologists, Tokyo, 353-372.
- Über Licht- und Farbperception
niederster Organismen
Pflügers Arch. ges. Physiol. 29,
387-400.
- Methods for Measuring Phototaxis
of Cell Populations and Individual
Cells
Physiol. Plantarum 20, 1083-1095.
- The Nature of the Photoreceptor
in Phototaxis.
In "Handbook of sensory physiology"
(W.R. LOWEENSTEIN, ed.) Vol. I,
365-395, Springer, Berlin, Heidel-
berg, New York.
- Photoeffects in a flavin-containing
lipid bilayer membrane and impli-
cations for algae phototaxis
Nature 248, 802-804.

- GOODWIN, T.W.
(1964) The Plastid Pigments of Flagellates
In "Biochemistry and Physiology
of Protozoa" (S. HUTNER, ed.),
Vol. III, 319-339,
Academic Press, New York.
- GÖSSEL, I.
(1957) Über das Aktionsspektrum der Photo-
taxis chlorophyllfreier Euglenen
und über die Absorption des Augen-
flecks
Arch. Mikrobiol. 27, 288-305.
- HÄDER, D.P.
(1974) Participation of Two Photosystems
in the Photo-phobotaxis of *Phormi-
dium uncinatum*
Arch. Mikrobiol. 96, 255-266.
- HAGER, A.
(1970) Ausbildung von Maxima im Absorp-
tionsspektrum von Carotinoiden im
Bereich um 370 nm;
Folgen für die Interpretation be-
stimmter Wirkungsspektren
Planta 91, 38-53.
- HAGER, A. &
PERZ, H.
(1970) Veränderung der Lichtabsorption
eines Carotinoids im Enzym
(De-epoxidase) - Substrat (Vio-
laxanthin) - Komplex
Planta 92, 314-322.
- HAND, W.G.,
COLLARD, P.A. &
DAVENPORT, D.
(1965) The effects of temperature and
salinity change on swimming rate
in the dinoflagellates
Goniaulax and *Gyrodinium*
Biol. Bull. 128, 90-101.

- HAND, W.G. &
DAVENPORT, D.
(1970)
The experimental analysis of phototaxis and photokinesis in flagellates
In "Photobiology of Microorganisms" (P. HALLDAL, ed.), 253-282, Wiley-Interscience, London, New York, Sidney, Toronto
- HAUPT, W.
(1959)
Die Phototaxis der Algen
In "Handbuch der Pflanzenphysiologie" Bd. XVII/1 (E. BÜNNING, ed.), 318-370, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg
- HAUPT, W.
(1966)
Phototaxis in Plants
Int. Rev. Cytol. 19, 267-299.
- HAUPT, W.
(1970)
Phototropismus
Fortschritte der Botanik, 32, 168-175, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- HAUPT, W.
(1972)
Bewegungen
Fortschritte der Botanik, 34, 225-235, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- KINNEY, MAC, G.
(1941)
Absorption of light by chlorophyllsolutions
J. biol. Chem. 140, 315-322.
- KOCH, W.
(1964)
Verzeichnis der Sammlung von Algenkulturen am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen,
Arch. Mikrobiol. 47, 402-432.

KUHL, L. &
LORENZEN, H.
(1964)

Handling and culturing of Chlorella
In "Methods in cell physiology",
Vol. I, (D. M. PRESCOTT, ed.),
159-187,
Academic Press, New York, London.

LINDES, D.A.,
DIEHN, B. &
TOLLIN, G.
(1965)

Phototaxigraph: recording instrument for determination of the rate of response of phototactic microorganisms to light of controlled intensity and wavelength
Rev. scient. Instr. 36, 1721-1725.

MAST, O.S.
(1911)

Light and the behavior of organisms
Wiley, New York .

NULTSCH, W.
(1973)

Phototaxis and photokinesis in bacteria and blue-green algae
In "Behaviour of Microorganisms"
(A. PEREZ-MIRAVATE, ed.), 70-81,
Plenum Press, London, New York .

NULTSCH, W.
(1974)

Movements
In "Algal physiology and biochemistry
(W.D.P. STEWART, ed.), 864-893,
Blackwell Oxford, London, Edinburgh, Melbourne .

NULTSCH, W.
(1975)

Phototaxis and Photokinesis
In "Primitive sensory and communication systems" (M.J. CARLILE, ed.),
29-90,
Academic Press, London, New York .

NULTSCH, W.,
THROM, G. &
RIMSCHA v., I.
(1971)

Phototaktische Untersuchungen an Chlamydomonas reinhardtii Dangeard
Arch. Mikrobiol. 80, 351-369.

- NULTSCH, W. &
HOFF, E.
(1973)
Neuere Untersuchungen zur Muster-
bildung bei Euglenen
Arch. Protistenk. 115, 336-352.
- PFEFFER, W.
(1904)
Pflanzenphysiologie
2. Auflg. Bd. 2,
W. Engelmann, Leipzig.
- PFENNIG, N. &
JANNASCH, H.B.
(1962)
Biologische Grundfragen bei der
homokontinuierlichen Kultur von
Mikroorganismen,
Ergebn. Biol. 25, 93-135.
- POHL, R.
(1948)
Tagesrhythmus im phototaktischen
Verhalten der *Euglena gracilis*
Z. Naturf. 3b, 367-374.
- SCHMIDT, J.A.,
CREUTZ, C. &
DIEHN, B.
(1972)
Factors controlling the expression
of phototaxis in *Euglena gracilis*
Abstract, VI Int. Congress on
Photobiol., p. 359, Bochum.
- SCHÖNBOHM, E.
(1967)
Die Hemmung der positiven und nega-
tiven Phototaxis des Mougeotia-
Chloroplasten durch Jodid-Ionen
Z. Pflanzenphysiol. 56, 366-374.
- SEITZ, K.
(1970)
Die Starklichtbewegung der Chloro-
plasten von *Vallisneria* in Abhän-
gigkeit von Hemmstoffen der oxy-
dativen Phosphorylierung
Z. Pflanzenphysiol. 63, 401-407.

- SENGER, H.
(1970)
- Charakterisierung einer Synchronkultur von *Scenedesmus obliquus*, ihrer potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthese-Quotienten während des Entwicklungscyclus
Planta 90, 243-266.
- SENGER, H.,
PFAU, J. &
WERTMÜLLER, K.
(1972)
- Continuous automatic cultivation of homocontinuous and synchronized micro-algae.
In "Methods in cell physiology", Vol. V, (D. M. PRESCOTT, ed.), 301-323,
Academic Press, New York, London.
- SONG, P.S. &
MOORE, T.A.
(1974)
- On the Photoreceptor Pigment for Phototropism and Phototaxis: Is a Carotenoid the most likely Candidate ?
Photochem. Photobiol. 19, 435-441.
- STRASBURGER, E.
(1878)
- Wirkung des Lichtes und der Wärme auf Schwärmsporen.
Jenaische Zeitschrift f. Naturwiss. 12, 551-625.
- STROTHER, G.K. &
WOLKEN, J.J.
(1960)
- Microspectrophotometry of *Euglena* Chloroplasts and Eyespot
Nature 188, 601-602.
- THOM, G.
(1968)
- Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von Phototaxis und Kinesis an *Rhodospirillum rubrum*
Arch. Protistenk. 110, 313-371.

- TOLLIN, G.
(1969)
Energy Transduction in Algal
Phototaxis
In "Current Topics in Bioener-
getics", Vol. III,
(D.R. SANADI, ed.), 417-446,
Academic Press, New York, London
- TOLLIN, G.
(1973)
Phototaxis in Euglena 11:
Biochemical Aspects
In "Behaviour of Microorganisms"
(A. PEREZ-MIRAVATE, ed.), 91-105,
Plenum Press, London, New York
- WARBURG, O.
(1919)
Über die Geschwindigkeit der
photochemischen Kohlensäurezer-
setzung in lebenden Zellen
Biochem. Z. 100, 230-270.
- WENDEROTH, K.
(1975)
Untersuchungen der photo-phobo-
taktischen Reaktionen einzelner
Diatomeenzellen
Diss. Marburg
- WOLKEN, J.J.
(1961)
Euglena
Rutgers University Press,
New Brunswick, N. J.
- WOLKEN, J.J. &
SHIN, E.
(1958)
Photomotion in Euglena gracilis
I. Photokinesis II. Phototaxis
J. Protozool. 5, 39-46.

DANKSAGUNG:

Herrn Prof. Dr. W. Nultsch danke ich für die Themenstellung und für sein stetiges Interesse, das er den Untersuchungen entgegenbrachte.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern des Botanischen Institutes danken, die durch Diskussionsbeiträge und technische Hilfelcistungen die Durchführung der Experimente unterstützten.

LEBENS LAUF:

- Am 26.11.1944 wurde ich in Großenhain/Sachsen als Sohn des Betriebsingenieurs Josef Hoff und dessen Ehefrau Johanna Hoff geb. Helwes geboren.
- Ab Ostern 1951
Ostern 1955 besuchte ich die Volksschule in Laasphe.
trat ich in die Sexta der Lahntalschule Biedenkopf ein.
- Am 18. 2.1965 bestand ich die Reifeprüfung an der Lahntalschule.
- Ab 7. 5.1965 studierte ich Biologie und Chemie an der Philipps-Universität Marburg.
- Am 26. 1.1971 bestand ich in Marburg die wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien.
- Vom 1. 3.1971 -
28. 2.1974 war ich Angestellter der Philipps-Universität Marburg im Fachbereich Biologie (Botanik).
- Vom 1. 3.1974 an war ich Studienreferendar am Studien-seminar in Giessen.
- Am 28. 5.1975 bestand ich in Giessen die Zweite Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien.
- Seit dem
1. 8.1975 bin ich als Studienrat z. A. am Theodor-Heuss-Gymnasium in Ratingen tätig.

